

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 11 月 6 日 (06.11.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/091278 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07K 5/00, 7/00, 16/44, C12N 9/99 (74) 代理人: 早坂 巧 (HAYASAKA, Takumi); 〒541-0041 大阪府 大阪市 中央区北浜2丁目5番13号 北浜平和ビル 2階 早坂国際特許事務所 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/05017
- (22) 国際出願日: 2003 年 4 月 18 日 (18.04.2003) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-121983 2002 年 4 月 24 日 (24.04.2002) JP
- (71) 出願人 および (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
- (72) 発明者: 森 啓 (MORI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒537-0025 大阪府 大阪市 東成区中道1丁目3番45号301 Osaka (JP).

[続葉有]

(54) Title: GAMMA-SECRETASE INHIBITORS

(54) 発明の名称: ガンマセクレターゼ阻害剤

(57) **Abstract:** It is intended, as compounds inhibiting the  $\gamma$ -secretase activity, compounds having an amino acid sequence which comprises at least 3 consecutive amino acids including the 11-th Leu in the amino acid sequence Val-Val-Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Val-Ile-Thr-Leu-Val-Met-Leu-Lys-Lys-Lys, has hydroxyethylene group(s) as a substitute for the peptide bond between the Leu and an amino acid immediately before and/or after the same, having an alkyloxycarbonyl group based on a C<sub>1-10</sub> alkyl group optionally substituted by phenyl or naphthyl at the N-terminus, having been alkyl-esterified or alkyl-amidated at the C-terminus by a C<sub>1-10</sub> alkyl group optionally substituted by phenyl or naphthyl, and optionally substituted at hydroxyl group of the 10-th Thr by a hydrophobic C<sub>1-4</sub> group or a Z group or its salt.

(57) 要約:

アミノ酸配列Val-Val-Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Val-Ile-Thr-Leu-Val-Met-Leu-Lys-Lys-Lysにおいて、第11番目のLeuを含む連続した少なくとも3個のアミノ酸よりなるアミノ酸配列よりなり、該Leuとその直前及び／又は直後に位置するアミノ酸との間にペプチド結合に代えてヒドロキシエチレン基を有し、N末端に、フェニル基又はナフチル基で置換されていてよいC<sub>1</sub>～10アルキルに基づくアルキルオキシカルボニル基を有し、C末端が、フェニル基又はナフチル基で置換されていてよいC<sub>1</sub>～10アルキルによるアルキルエステル化又はアルキルアミド化されており、第10番目のThrのヒドロキシル基の水素が炭素数1～4の疎水性基又はZ基により置換されていてもよいものである化合物又はその塩が、 $\gamma$ セクレターゼ活性を阻害する化合物として開示されている。



(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

-1-

## 明 細 書

## ガンマセクレターゼ阻害剤

5

## 技術分野

本発明は、アミロイド前駆体タンパク質からアミロイドタンパク質を産生する分解酵素であるガンマセクレターゼを阻害する化合物に関する。さらに詳しくは、本発明は、該化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩、これらを含んでなるガンマセクレターゼ阻害剤、抗老化薬又は抗痴呆薬のスクリーニングにおける該化合物の使用及び該化合物に対する抗体に関する。

10

## 背景技術

アミロイドタンパク質はアルツハイマー病、ダウン症ばかりでなく正常に老化した脳組織にあらわれる組織病変である。このアミロイドタンパク質は疎水性アミノ酸に富む40個から42個/43個のアミノ酸からなり、その前駆体であるアミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein、以下APPという。) から加水分解切断によって産生される。APPは695個、751個あるいは770個のアミノ酸からなる、膜を1回通過するタイプ1型膜タンパク質であり、アミノ末端側が細胞外にある。アミノ酸数の違いは細胞外領域にあるキュニッツ型と呼ばれるプロテアーゼインヒビター活性部位の有無による。神経細胞では695個のアミノ酸からなるAPP (以下、「APP695」といい、そのアミノ酸配列を配列番号7に示す) が主成分になっている。APP695は、1番目のメチオニンから695番目のアスパラギンまでのアミノ酸695個からなる、主として神経細胞で発現しているアイソフォームであり、細胞膜を1回通過する膜通過ドメイン (625番目のグリシンから648番目のロイシンまでの24個のアミノ酸) をもつタイプ1型膜タンパク質である。アミロイドタンパク質は、APP695の細胞外部にある597番目のアスパラギン酸から細胞膜内の636番目のバリンまでのアミノ酸40個の短いタンパク質分子種と、638番目のアラニンあるいは639番目のトレオニンまでのアミノ酸42個あるい

15

20

25

-2-

は43個からなる長いタンパク質分子種からなる。

一方、アミノ酸770個からなるAPP（以下、「APP770」といい、そのコード領域の塩基配列を配列番号8に、アミノ酸配列を配列番号9に示す。）は、1番目のメチオニンから770番目のアスパラギンまでのアミノ酸770個からなるAPP遺伝子  
5 であり、APP695分子種にないアミノ酸配列（289番目のグルタミン酸から363番目のリジンまでの75個のアミノ酸）を含む。この挿入アミノ酸配列以外はAPP695と全くアミノ酸配列をもつ分子種である。APP695、APP770以外にはAPP751というアイソフォームがあるが、これはAPP770の345番目のメチオニンから363番目のリジンの19個のアミノ酸がなく、全部で751個のアミノ酸からなる。APP751とAPP770  
10 に共通して挿入されるアミノ酸配列（APP770のアミノ酸配列で示すと、289番目のグルタミン酸から344番目のアラニンまでの56個のアミノ酸）はキュニッツ型プロテアーゼインヒビターの活性があり、神経細胞以外の細胞において発現されていると考えられている。

アミロイドタンパク質の生理活性については神経細胞毒性があるとする考えが  
15 実験的に証明されて〔Yankner, -B-A; Dawes, -L-R; Fisher, -S; Villa-Komaroff, -L; Oster-Granite, -M-L; Neve, -R-L. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. (1989) Science. 245 (4916): 417-20、及び、Yankner, -B-A; Duffy, -L-K; Kirschner, -D-A. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. (1990) Science. 1990 250 (4978): 279-82〕以来、アルツハイマー病発症の鍵分子と考えられている。アミロイド前駆体タンパク質からアミロイドタンパク質が産生されるためには2段階の重要な反応がおこななければならない。第1段階は $\beta$ セクレターゼによるアミロイドタンパク質のアミノ末端側の切断である。第2段階は、 $\gamma$ セクレターゼによるアミロイドタンパク質のカルボキシル末端側で切断され、アミロイドタンパク質の遊離とAPPの細胞質断片の解離を生じることになる。従来の知見では、第2段階の切断点のアミロイドタンパク質のカルボキシル末端であるガンマ（ $\gamma$ ）部位（APP770でいうアミノ酸残基で711番目のバリンと712番目のイソロイシン間、713番目のアラニンと714番  
25

目のトレオニン間あるいは714番目のトレオニンと715番目のバリン間)で生じていると考えられてきたが、最近の知見ではさらにアミノ酸残基5から10個分下流(カルボキシル末端方向)の細胞質寄りのイブシロン( $\epsilon$ )部位(APP770でいうアミノ酸残基で719番目のトレオニンと720番目のロイシン間あるいは720番目のロイシンと721番目のバリン間)で生じるとする報告がある。

アルツハイマー病の脳内神経病変は、臨床的な異常症状である失見当識、記憶低下、記憶喪失、判断力低下、行動異常などが生じる前に生じている。神経病変は、アミロイドタンパク質の沈着と神経原線維変化、細胞脱落変性であるが、この中でも、アミロイドタンパク質の沈着は最初期の病理反応である。

10 アルツハイマー病の進行には、アミロイドタンパク質の産生・沈着によって引き起こされているとするアミロイド仮説が重要であると考えられており、その根拠として家族性アルツハイマー病研究がある。

$\gamma$ セクレターゼは、早期発症型家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として発見された、染色体14にあるプレセニリン1 [Sherrington, -R; Rogaev, -E-I; Liang, -Y; Rogaeva, -E-A; Levesque, -G; Ikeda, -M; Chi, -H; Lin, -C; Li, -G; Holman, -K; et-al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. (1995) Nature, 375 (6534), 754-760] とプレセニリン2 [Levy-Lahad, -E; Wasco, -W; Poorkaj, -P; Romano, -D-M; Oshima, -J; Pettingell, -W-H; Yu, -C-E; Jondro, -P-D; Schmidt, -S-D; Wang, -K; et-al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. (1995) Science, 269 (5226), 973-977、及び、Rogaev, -E-I; Sherrington, -R; Rogaeva, -E-A; Levesque, -G; Ikeda, -M; Liang, -Y; Chi, -H; Lin, -C; Holman, -K; Tsuda, -T; et-al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. (1995) Nature 376 (6543), 775-778] の遺伝子産物であるとする考えもあるが、なお確定していない。

APPもまた早期発症型家族性アルツハイマー病の原因遺伝子である (Goate, A. et al Nature 1991) ことから、1つのアルツハイマー病という痴呆症の病因に

複数の因子が関連していることが示されている。

前述のように、アミロイドタンパク質は2つの構成成分を含む。1つはアスパラギン酸から始まり40番目のバリンで終了する短いアミロイドタンパク質成分と、この40個のアミノ酸からなる成分と同じくアスパラギン酸から始まるが2  
5 残基分のアミノ酸もしくは3残基分のアミノ酸だけ長い42番目のアラニンあるいは43番目のトレオニンで終了する42個あるいは43個のアミノ酸からなる長いアミロイドタンパク質成分である。後者の長い成分は疎水性が高くより難溶性である。この長い成分が核となりこれに短い成分が付加することによって、直径約5から6nmの線維状のアミロイド線維が形成される。

- 10 プレセニリン1あるいはプレセニリン2に遺伝変異が存在すると、長いアミロイドタンパク質の産生が増加することが示されている。この変異効果によって、アミロイドタンパク質重合の閾値を決定していると考えられている長いアミロイドタンパク質成分が多量に形成され、病因反応を加速すると考えられている。

- APPにも多くの遺伝変異が同定されているが、代表的な変異は大きく、アミロ  
15 イドタンパク質のアミノ末端の直前にあるスウェーデン変異 (Met670Asn、Lys671Leu : 但しAPP770のアミノ酸番号に従う。以下、変異型について同じ。)、オランダ型変異 (Glu693Gln)、ロンドン変異 (Val717Ile) 及びオーストラリア変異 (Leu723Pro) に分けられる。スウェーデン変異では2つのアミロイドタンパク質成分の産生が増加するが、ロンドン変異やオーストラリア変異では長いアミロ  
20 イドタンパク質成分のみの産生が増加する。オランダ型変異の意義についてはなお議論の途上であり、結論は得られていない。

- アポリポタンパク質Eの危険因子アレルとしてE4がある。一方のみの染色体アレルがE4の場合で8年から10年、両方の染色体アレルがE4/E4になった場合は16年から20年、アルツハイマー病の発症が早まることが統計学的に証明され  
25 ている (Corder, -E-H; Saunders, -A-M; Strittmatter, -W-J; Schmechel, -D-E; Gaskell, -P-C; Small, -G-W; Roses, -A-D; Haines, -J-L; Pericak-Vance, -M-A. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. (1993) Science. 261 (5123) : 921-3)。

$\beta$ セクレターゼおよび $\gamma$ セクレターゼの活性阻害はアミロイドタンパク質産生を抑制し、アルツハイマー病の進行を停止もしくは遅らせられる治療薬になると考えられる。APPの加水分解の第1段階では、 $\beta$ セクレターゼ以外にも $\alpha$ セクレターゼ反応があるが、第2段階である $\gamma$ セクレターゼ反応は両者の第1段階に共通して生じることからより広いスペクトル効果が期待される。

$\gamma$ セクレターゼの同定については未だ最終的な結論が得られていないが、プレセニリン1が重要な役割をもっていることは証明されている。このプレセニリン1の働きを無くした動物実験や培養細胞での実験によると、脳神経発生や脊柱形成異常あるいはリンパ球発生の異常が生じるという。つまりプレセニリン1はアミロイドタンパク質以外にも多様な作用があることが知られている。

$\gamma$ セクレターゼの非特異的な活性抑制は癌化誘導などの重篤な副作用を誘導する可能性があるということを考えなくてはならない (Hardy, J., Israel, A. Alzheimer's disease. In search of gamma-secretase. (1999) Nature. 398 (6727), 466-7)。

現在知られている $\gamma$ セクレターゼ阻害剤としては、その酵素が作用するアミロイドタンパク質のカルボキシル末端にある基質APPの $\gamma$ 部位の報告 (Mori H., Takio K., Ogawara M. & Selkoe D. J. Mass spectrometry of purified amyloid b protein in Alzheimer's disease. (1992) J. Biol. Chem. 267, 17082-17086; Roher A. E., Lowenson J. D., Clarke S., Wolkow C., Wang R., Cotter R. J., Reardon I. M., Zurcher-Neely H. A., Heinrichson R. L., Ball M. J., et al. Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. (1993) J Biol Chem. 268 (5), 3072-3083) に基づくペプチド模倣化合物である阻害剤と、アスパラギン酸活性部位が重要であるとの報告 (Wolfe M. S., Xia W., Ostaszewski B. L., Diehl T. S., Kimberly W. T., Selkoe D. J. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. (1999) Nature 398 (6727), 513-517) にもとづく酵素阻害剤とがある。

-6-

ペプチド模倣化合物としてはDFK-167 [Wolfe M. S., Citron M., Diehl T. S., Xia W., Donkor I. C. and Selkoe D. J.: A substrate-based difluoro ketone selectively inhibits Alzheimer's  $\gamma$ -secretase activity. (1998) J. Med. Chem., 41 (1), 6-9] が知られている。

- 5 酵素阻害剤としては、既知阻害剤の中からスクリーニングされた化合物が報告されている。すなわち、エイズ治療薬開発の過程で作成されたL-685, 458 [Shearman, M. S., Beher, D., Clarke, E. E., Lewis, H. D., Harrison, T., Hunt, P., Nadin, A., Smith, A. L., Stevenson, G., Castro, J. L. L-685, 458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity. (2000) Biochemistry 39 (30), 8698-8704] と、 $\alpha$ -キモトリプシン阻害剤であるJLK-6 [Nakajima, K., Powers, J. C., Ashe, B. M., Zimmerman, M. Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. Studies with peptide substrates related to the alpha 1-protease inhibitor reactive site. (1979) J. Biol. Chem. 254 (10), 4027-32] とがある。

- 15 基質APPの $\gamma$ 部位に基づくペプチド模倣化合物の阻害剤と酵素活性部位に基づく阻害剤のいずれもがアミロイドタンパク質産生の強力な阻害剤であるが、各々重大な問題点がある。まず、DFK-167は $\gamma$ 部位に対して設計された阻害剤であり、最近の知見である $\epsilon$ 部位での知見とは全く独立した化合物であり、阻害剤の設計目標が異なる。阻害剤L-685, 458やJLK-6は、本来APPのアミロイドタンパク質産生をする $\gamma$ セクレターゼに対する特異的な阻害剤として開発された化合物ではないことがあげられる。 $\gamma$ セクレターゼ阻害剤としての特異性の問題点以外にも標的組織での有効性などの課題もある。

## 25 発明の開示

本発明が解決しようとする課題の一つは、 $\gamma$ セクレターゼ活性を阻害する新規な化合物提供することである。

本発明の更なる課題は、 $\gamma$ セクレターゼ側ではなく、基質であるAPPのアミノ



-7-

酸配列に焦点を当てた $\gamma$ セクレターゼ阻害化合物を提供することである。

本発明の更なる課題は、最新の、 $\varepsilon$ 部位に関する知見に準拠した $\gamma$ セクレターゼ阻害化合物を提供することである。

- 本発明の尚も更なる課題は、アルツハイマー病をはじめとする類縁疾患の診断
- 5 方法、有用な治療薬・治療方法、治療薬開発のスクリーニング方法等を提供することである。ここでいう類縁疾患とは、ダウン症をはじめとする、アミロイドタンパク質が直接・間接に病因として関与することが知られ又は可能性が疑われている疾患、及びアミロイドタンパク質が神経病変中に認められる疾患をいう。

- 本発明は、関連の研究知見に照らしつつ、APPの（ $\gamma$ 部位ではなく） $\varepsilon$ 部位に
- 10 着目して創意工夫を重ねた結果、APPの $\varepsilon$ 部位を含む数個のアミノ酸配列と類似の化学構造を有するがしかし酵素切断部位である $\varepsilon$ 部位のLeuとその直前及び／又は直後に位置するアミノ酸との間のペプチド結合を酵素に対し安定な結合に置き換えたペプチド類似化合物が、 $\gamma$ セクレターゼを阻害してアミロイドタンパク質産生を抑制することを見出し、それに基づき本発明を完成させた。

- 15 すなわち、本発明は以下を提供する。

- （１）アミノ酸配列Val-Val-Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Val-Ile-Thr-Leu-Val-Met-Leu-Lys-Lys-Lys（配列番号１）において、第１１番目のLeuを含む連続した少なくとも３個のアミノ酸よりなるアミノ酸配列よりなり、該Leuとその直前及び／又は直後に位置するアミノ酸との間において、ペプチド結合-CO-NH-に代えて
- 20 ヒドロキシエチレン基-CHOH-CH<sub>2</sub>-を有し、他のアミノ酸間の結合はペプチド結合であり、且つN末端に、フェニル基又はナフチル基で置換されていてよい炭素数１～１０のアルキルに基づくアルキルオキシカルボニル基を有し、C末端が、フェニル基又はナフチル基で置換されていてよい炭素数１～１０のアルキルによるアルキルエステル化又はアルキルアミド化されてされており、第
- 25 １０番目のThrのヒドロキシル基の水素が炭素数１～４の疎水性基又はZ基により置換されていてよいものであることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩、

- （２）上記（１）の化合物において、該アミノ酸配列の第１４番目のLeuがIleで

あってよい疎水性アミノ酸又はProで置換され、第11番目のLeuが、Ileであってよい疎水性アミノ酸で置換され、又は第10番目のThrがSerで置換され、又は第9番目のIleが、Leuであってよい疎水性アミノ酸で置換されていることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩、

- 5 (3) アミノ酸配列Ile-Thr-Leu-Val-Met-Leu (配列番号2) において、第3番目のLeuを含む連続した3、4、5又は6個のアミノ酸よりなるアミノ酸配列よりなり、該Leuとその直前及び／又は直後に位置するアミノ酸との間において、ペプチド結合-CO-NH-に代えてヒドロキシエチレン基-CHOH-CH<sub>2</sub>-を有し、他のアミノ酸間の結合はペプチド結合であり、且つN末端に、フェニル基又はナフチル基で置換されていてよい炭素数1~10のアルキルに基づくアルキルオキシカルボニル基を有し、C末端が、フェニル基又はナフチル基で置換  
10 されていてよい炭素数1~10のアルキルによるアルキルエステル化又はアルキルアミド化されてされており、Thrのヒドロキシル基の水素が炭素数1~4の疎水性基又はZ基により置換されていてよいものであることを特徴とする化合物  
15 又はその薬剤学的に許容し得る塩、

- (4) アミノ酸配列Leu-Val-Met-Leu (配列番号3) において、第1番目のLeuと第2番目のValと間において、ペプチド結合-CO-NH-に代えてヒドロキシエチレン基-CHOH-CH<sub>2</sub>-を有し、他のアミノ酸残基間の結合はペプチド結合であり、且つN末端に、フェニル基又はナフチル基で置換されていてよい炭  
20 素数1~10のアルキルに基づくアルキルオキシカルボニル基を有し、C末端が、フェニル基又はナフチル基で置換されていてよい炭素数1~10のアルキルによるアルキルエステル化又はアルキルアミド化されていることを特徴とする化合物  
物又はその薬剤学的に許容し得る塩、

- (5) アミノ酸配列Thr-Leu-Val-Met (配列番号4) において、第1番目のThrと  
25 第2番目のLeuとの間において、ペプチド結合-CO-NH-に代えてヒドロキシエチレン基-CHOH-CH<sub>2</sub>-を有し、他のアミノ酸間の結合はペプチド結合であり、且つN末端に、フェニル基又はナフチル基で置換されていてよい炭素数1~10のアルキルに基づくアルキルオキシカルボニル基を有し、C末端が、

フェニル基又はナフチル基で置換されていてよい炭素数1～10のアルキルによるアルキルエステル化又はアルキルアミド化されてされており、Thrのヒドロキシル基の水素が炭素数1～4の疎水性基又はZ基により置換されていてもよいものであることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩、

- 5 (6) 上記(3)の化合物であって、Valの直前に位置するLeuが、Ileであってよい疎水性アミノ酸により置換され、又はN末端のLeuがIleであってよい疎水性アミノ酸若しくはProにより置換されていることを特徴とする化合物及びその薬剤学的に許容し得る塩、

- 10 (7) 上記(4)の化合物であって、Valの直前に位置するLeuが、Ileであってよい疎水性アミノ酸により置換され、又はN末端のLeuがIleであってよい疎水性アミノ酸若しくはProにより置換されていることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩、

- 15 (8) 上記(5)の化合物であって、Valの直前に位置するLeuが、Ileであってよい疎水性アミノ酸により置換されていることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩、

(9) 上記(3)の化合物であって、ThrがSerにより置換されていることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩、

- 20 (10) 上記(3)の化合物であって、Ileが、Leuであってよい疎水性アミノ酸により置換されていることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩、

(11) 上記(5)の化合物であって、ThrがSerにより置換されていることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩、

- 25 (12) 上記(1)ないし(11)の何れかの化合物であって、該アルキルオキシカルボニル基がBoc基であることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩、

(13) 上記(1)ないし(12)の何れかの化合物において、アルキルオキシカルボニル基の代わりにTyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg(配列番号5)よりなるポリペプチドを融合して有することを特徴とする化合物又はそ

の薬剤学的に許容し得る塩。

(14) 上記(1)ないし(13)の何れかの化合物を含んでなるガンマセクレターゼ阻害剤、

(15) 上記(1)ないし(13)の何れかの化合物に対する抗体、

- 5 (16) アミロイドタンパク質生成阻害薬のスクリーニングにおける上記(1)ないし(13)の何れかの化合物の、ガンマセクレターゼ阻害剤としての使用。

本発明の化合物及びその薬剤学的に許容し得る塩は、アルツハイマー病及びその類縁疾患、例えば、ダウン症をはじめとする、アミロイドタンパク質が直接・間接に病因として関与することが知られ又は可能性が疑われている疾患、及びアミロイドタンパク質が神経病変中に認められる疾患の治療に、及び治療薬のスクリーニングのために用いることができる。また本発明の抗体は、例えば、治療のためにヒトに投与された本発明の化合物の血中濃度等を測定するために使用することができる。

10

15

#### 図面の簡単な説明

図1は、合成経路を示すフローチャートの最初の一部を示す。

図2は、図1に続くフローチャートの一部を示す。

図3は、図2に続くフローチャートの一部を示す。

図4は、図3に続くフローチャートの一部を示す。

- 20 図5は、図2に続くフローチャートの最後の一部を示す。

図6は、化合物5の合成ステップを示す。

図7は、別の化合物の合成経路を示すフローチャートの最初の一部を示す。

図8は、図7に続くフローチャートの一部を示す。

図9は、図8に続くフローチャートの一部を示す。

- 25 図10は、図9に続くフローチャートの一部を示す。

図11は、図10に続くフローチャートの一部を示す。

図12は、図11に続くフローチャートの最後の一部を示す。

## 発明を実施するための最良の形態

本発明において、アルキルオキシカルボニル基における「アルキル」は、炭素数1～10、より好ましくは炭素数1～7、更に好ましくは炭素数1～5のアルキルである。そのようなアルキルは、直鎖のものでも、分岐を有するものでもよく、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、*t*-ブチル、*n*-ペンチル、イソペンチル、2-メチルブチル、2, 2-ジメチルプロピル、*t*-ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル等が挙げられる。例えば*t*-ブチルは特に好ましい一例である。またそれらは、何れか1つ又は2つ以上の水素原子がフェニル基又はナフチル基で置換されたものであってもよい。そのような置換体の特に好ましい例の一つとして、ベンジルオキシカルボニル基が挙げられる。

また本発明において、「アルキルエステル化又はアルキルアミド化」における、「アルキル」は、炭素数1～10、より好ましくは炭素数1～7、更に好ましくは炭素数1～5のアルキルである。そのようなアルキルは、直鎖のものでも、分岐を有するものでもよく、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、*t*-ブチル、*n*-ペンチル、イソペンチル、2-メチルブチル、2, 2-ジメチルプロピル、*t*-ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル等が挙げられる。それらの特に好ましい例として、メチル及び*t*-ブチルが挙げられる。またそれらは、何れか1つ又は2つ以上の水素原子がフェニル基又はナフチル基で置換されたものであってもよい。そのような置換体の特に好ましい例の一つとして、ベンジル基が挙げられる。

また本発明において、Thrのヒドロキシル基の水素が炭素数1～4の疎水性基又はZ基（すなわち、カルボベンゾキシ基）によって置換されているとき、それら炭素数1～4の疎水性基の例としては、メチル、エチル、プロピル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、*t*-ブチル等の疎水性保護基が挙げられる。

また本発明において、「アミノ酸」というときは、L-アミノ酸を意味する。

本発明のペプチド模倣化合物は、APP分解物に関するこれまでの研究成果に照らし、酵素に対するε部位の安定化によりγセクレターゼ活性を阻害する

ことが可能であるとの仮定のもとに、 $\epsilon$  部位の構造と類似でありしかも酵素に対し安定化された化合物を作り出す試みから得られたものであり、孤発性アルツハイマー病のアミロイド産生のみならず早期発症型家族性アルツハイマー病の遺伝変異を有するアミロイド産生に対しても抑制活性が確認された。

- 5 APPの $\epsilon$  部位付近と同様のアミノ酸配列を有するがしかし $\gamma$ セクレターゼによる切断部位を安定化させるように変更した種々のペプチド類似化合物で、 $\gamma$ セクレターゼ阻害活性を有するものを、本発明の目的に使用することができる。例えば、 $\epsilon$  部位付近のあるアミノ酸残基-NH-CHR-CO-を、Rについて類似の性質（疎水性／親水性、酸性／塩基性、イオウの有無、ヒドロキシル基の有無
- 10 等）を有する他のアミノ酸残基で置換した形の化合物であって $\gamma$ セクレターゼ阻害活性を有するものが、そのような化合物の例である。例えば、Leuに置換できるアミノ酸としてはIle、Val、Ala、Gly等が、Ileに置換できるアミノ酸としてはLeu、Val、Ala、Gly等が、Thrに置換できるアミノ酸としてはSer等が、Metに置換できるアミノ酸としてはAla等が、Alaに置換できるアミノ酸としてはGly、
- 15 Val、Ile、Leu等が、Lysに置換できるアミノ酸としてはArg、His等が、それぞれ挙げられる。また、配列番号1における14番目のLeu（配列番号2における第6番目のLeu、及び配列番号3における第4番目のLeuに同じ。）については特に、Proによっても置換してよい。これは、当該部位のアミノ酸がProに変異している変異体では、A $\beta$ 42アミロイドタンパク質の成分が増加すること（すなわち、
- 20 そのような変異体タンパク質が $\gamma$ セクレターゼに対する高い親和性を有することを示唆する）が報告されているからである（Kwok, -J-B; Li, -Q-X; Hallupp, -M; Whyte, -S; Ames, -D; Beyreuther, -K; Masters, -C-L; Schofield, -P-R, Novel Leu723Pro amyloid precursor protein mutation increases amyloid beta42 (43) peptide levels and induces apoptosis. Ann-Neurol. 2000 Feb; 47 (2): 249-5
- 25 3）。

本発明の化合物を合成するための素材および合成の各ステップにおいて用いる方法は、周知であるから、当業者は合成、単離、精製等を適宜行なって目的とする化合物を適宜製造することができる。また大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、

- 動物細胞、植物細胞の自体公知の宿主を利用した遺伝子組み換え技術によって、本発明の化合物のポリペプチド部分を製造することも可能である。化学合成としては、例えば、後述の実施例に準じて行なうことができるが、目的とする化合物が得られる限り、いかなる方法を用いてもよい。例えば周知の方法である Boc (
- 5 t-ブチルオキシカルボニル) 化反応、DMSO酸化、アルカリ反応、酸性反応、エポキシ化反応、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、アルキル化反応、ケン化反応、加熱反応、脱炭酸反応、縮合反応、逆相高速液体クロマトグラフィー等を適宜組み合わせで行なうことができる。好ましくは、本発明の化合物の構造要素部分を順次反応させ、効率と反応物純度の検定を適宜実施する方法をとる。
- 10 本発明の化合物は、合成や精製を促進するための修飾、物理・化学的安定化を促進するための修飾、生体内の代謝に対する安定性と不安定性、条件付けの等の活性化修飾、更には、脳血管関門通過を含む臓器搬送効率の高進と低下をもたらす制御修飾を含むものであってよい。ここにいう制御修飾としては、Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg (配列番号 3) の11個のアミノ酸よりなる
- 15 配列を指す (Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S. F. *In vivo protein transduction: Delivery of a biologically active protein into the mouse* Science 285: 1569-1572)。N末端側にペプチド結合で連結された該制御配列を含むことにより、該化合物は、血液脳関門の通過が容易化され、脳内の目標部位によりよい効率で到達することが可能となる。
- 20 本発明の化合物のその他の修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質又は脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、交差架橋、環化、ジスルフィド結合、脱メチル化、交差架橋共有結合形成、シスチン形成、ピログルタメート形成、ホルミル化、ガン
- 25 マーカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質加水分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、脂質結合、硫酸化、セレノイル化、アルギニル化のようなトランスファーRNA媒介のタンパクへのアミノ酸の添加、ならびにユビキチ

ネーション等がある。

更に、本発明の化合物および抗体の検出もしくは精製を容易にするために、または別の機能を付加するために、構造の付加、変更、置換することは技術的に容易であり、これらの生成物も本発明の範囲に包含される。なお、修飾付加にはFL

- 5 AG-tag、 $\beta$ ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、IgG等の免疫グロブリンFc断片やGFP等の遺伝子工学手法による生成物も本発明の範囲に包含される。

〔抗体〕

- 抗体は、本発明の化合物およびその誘導体あるいはその分解物を選別し、これらを抗原として用いて精製することができる。抗原は当該化合物あるいはそれらの派生物でもよく、例えば20個以下のアミノ酸残基、好ましくは5個以下のアミノ酸残基、さらに好ましくは3個、最も好ましくは2個のアミノ酸残基で構成される。精製にはそれらの抗原を組み合わせ用いてもよい。抗原としては必ずしも本発明の化合物およびその誘導体あるいはその分解物そのものでなくとも、APPの $\epsilon$ 部位近傍の一次配列を立体構造上外部へ露出して有する化合物であれば
- 10 よい。ここでいう近傍とは、2ヶ所ある $\epsilon$ 部位からアミノ末端側およびカルボキシル末端側へ4個までのアミノ酸までの領域を指す。

- また本発明の化合物およびその誘導体あるいはその分解物に対する免疫特異的な抗体を作製するためには、上記した $\epsilon$ 部位近傍の構造のアミノ酸配列を含んだ化合物を抗原として用いることが好ましい。好ましい抗体としては、例えば次の
- 20 ものが挙げられる。

(1) Val-Val-Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Val-Ile-Thr (配列番号10) のカルボキシル末端のトレオニンを認識する抗体、

(2) Val-Val-Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Val-Ile-Thr-Leu (配列番号11) のカルボキシル末端のロイシンを認識する抗体、

- 25 (3) Leu-Val-Met-Leu-Lys-Lys-Lys (配列番号12) のアミノ末端のロイシンを認識する抗体、

(4) Val-Met-Leu-Lys-Lys-Lys (配列番号13) のアミノ末端のバリンを認識する抗体、



(5) 前記 (1) から (4) までのアミノ酸配列において認識されるアミノ酸を含む少なくとも2つの連続するアミノ酸を有する抗原を用いて得られる抗体。

これらの抗体は、当該部位に免疫学的に結合またはこれを認識する限り、種類及び量は特に限定されない。抗体の結合または認識の有無は、公知の抗原抗体反応によって決定される。「免疫特異的」とは、先行技術の他の関連タンパク質あるいは化合物よりも、当該化合物に対する親和性が実質的に大きいことを意味する。

抗体の生産は、本発明の化合物およびその誘導体あるいはその分解物を抗原として、アジュバントの存在または非存在下に、単独または担体に結合あるいは同居した状態で、該抗原に対して体液性応答および/または細胞性応答の免疫誘導を行うことによって実施される。あるいは培養条件下でリンパ球もしくはその前駆細胞を免疫刺激することによっても免疫誘導することができる。担体は、それ自体が宿主に対して有害作用をおこさなければ、特に限定されず例えばセルロース、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、重合アミノ酸、アルブミンおよびそれらの混合物等が例示されるがこれに限らない。免疫される動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ、ウシ等が好適に用いられる。ポリクローナル抗体は、自体公知の方法により血清として、また血清からの抗体回収法によって取得される。好ましい手段としては、免疫アフィニティークロマトグラフィー法が挙げられる。

モノクローナル抗体の生産は、上記の免疫誘導した動物から抗体活性を含む組織（例えば脾臓またはリンパ節）あるいは培養細胞を回収し、自体公知の永久増殖性細胞（例えば、P3X63Ag8株等のミエローマ株）への形質転換手段を導入することによって行われる。例えば、上記抗体産生細胞と永久増殖細胞とから作製されたハイブリドーマをクローン化し、本発明に係る新規な化合物を特異的に認識する抗体を産生しているハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。実例としては、ハイブリドーマ法 (Kohler G. and Milstein C. (1975) Nature 256, 495-497)、トリオーマ法 (Kozbor et al. Immunology Today (1983) 4: 72)、およびEBV法 (Cole et al. Monoclonal antibodies an

d cancer therapy, Alan R. Liss, Inc., (1985): 77-96) に記載されるような種々の技法がある。

上記抗体は、本発明の化合物およびその誘導体あるいはその分解物の同定、検出、定量、あるいはアフィニティークロマトグラフィーによる該化合物の調製と  
5 精製に用いることができる。上記抗体はヒト型抗体へと、自体公知の手法を用いて改変することができる。

具体的には、本発明の化合物およびその誘導体あるいはその分解物、およびそれらに対する特異的抗体で本発明の化合物およびその誘導体あるいはその分解物の活性を増加させる活性を持つものは、アミロイドタンパク質生成阻害薬のスク  
10 リーニングに付される化合物の標準物として、またスクリーニング手段として有用である。

本発明の化合物は、アルツハイマー病およびその類縁疾患に対し、有効量を医薬上許容される担体に入れて若しくは単独で患者に投与して、アミロイドタンパク質産生量を制御しそれにより、それらの疾患の予防、治療、及び症状を改善の  
15 ため用いられる。本発明の化合物には、該化合物の脳組織への輸送効率を高める適切な製剤化を施してよい。

本発明の化合物は、そのうち1種を単独で使用しても、あるいは複数を組み合わせて使用してもよい。更には、治療上有利となる他の化合物と併用してもよい。本発明の化合物を含んでなる医薬品組成物の全身投与の好ましい形態は、注射  
20 であり、とりわけ静脈注射である。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路を用いることもできる。全身投与のための別の手段は、胆汁酸塩またはフクジン酸または他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜または経皮投与である。さらに、腸溶処方またはカプセル処方うまく処方されるならば、経口投与も可能である。これらの医薬品組成物の投与は局所的なものであってもよく、膏  
25 薬、パスタ、ゲル等の形態であってもよい。

本発明の化合物およびその誘導体あるいはその分解物に対する抗体を用いたアッセイ法としては、ラジオイムノアッセイ、競争結合アッセイ、高速液体クロマトグラフィー、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイ等ならびにこれら

-17-

の組み合わせが挙げられる。

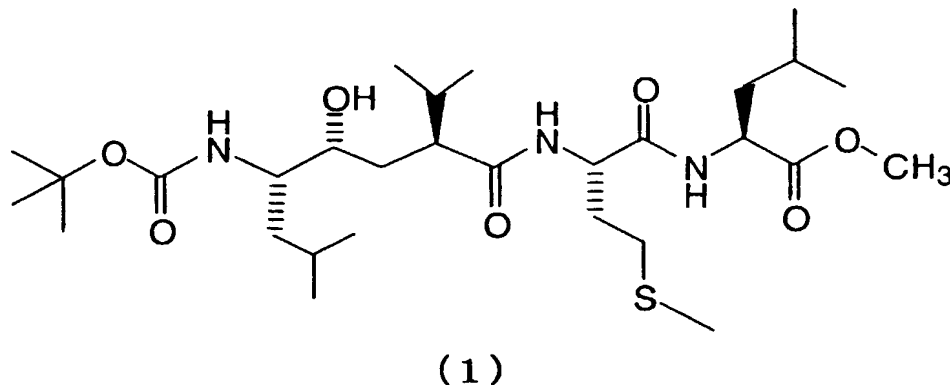
〔実施例〕

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

5 〔実施例1〕 化合物Boc-Leu\*-Val-Met-Leu-OMeの合成

図1～5に示す合成経路に沿って、Boc-Leu\*Val-Met-Leu-OMe〔式中、「\*」は、LeuとValの間のペプチド結合「-CO-NH-」がドロキシエチレン基「-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-」に置き換えられていることを示す。〕を以下のようにして合成した。該化合物において、ヒドロキシエチレン基の $\alpha$ 炭素周りの立体構造とし

10 てはR型のものを選択した。当該化合物の構造式を式(1)に示す。



L-ロイシノール塩酸塩(2) (9.87g, 64.2 mmol) をアセトン100 ml, 水50 mlを加えて溶解、トリエチルアミン(21.5 ml, 128 mmol)を加えて-10℃に冷却した。-10℃でBoc<sub>2</sub>O(20 g, 92 mmol)を滴下、その後冷却を外して終夜攪拌後、アセトンを留去、0.1 M塩酸約500 mlを加えて酢酸エチル500 mlで抽出した。有機層を0.1 M塩酸、水、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、乾燥剤を濾去後、濃縮した。シリカゲルオープンカラム(250 g, 酢酸エチル/ヘキサン=1/3)で精製して目的物Boc-ロイシノール(3)を得た。収量12.88 g(92%)。

Boc-ロイシノール(3) (12.88g, 58.9 mmol) をトルエンフラッシュ後、アルゴン置換した。ジメチルスルフォキシド(脱水、200 ml)に溶解、トリエチ

- ルアミン (22 ml, 158mmol) を加えて15℃の水浴で冷却する。一方、別のフラスコにて、アルゴン気流下、三酸化硫黄ピリジン錯体 (25.3 g, 159 mmol) を脱水 DMSO (100 ml) に溶解、10分間攪拌する。Boc-ロイシノール (3) の溶液中へ、15℃冷却下、三酸化硫黄溶液を滴下し (4分) その後、8分攪拌後、冷水1500 ml 中へ反応混合物を投入して反応を終了した。酢酸エチルで抽出し、有機層を0.1 M塩酸、水、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、乾燥剤を濾去後、濃縮した。シリカゲルオープンカラム (250 g, 酢酸エチル/ヘキサン=1/5) で精製して目的物 Boc-Leu-H (アルデヒド) (4) を得た。収量10.9 g (85.8%)。
- 10 水素化ナトリウム (鋇油中62.6%) を0.53gの鋇油を除去しアルゴン置換した。これにDMSO (脱水、50ml) を加え50℃に加温、1時間攪拌し、これにTHF (脱水、50 ml) を加えて氷冷した。(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si (3.1 g, 15.2 mmol) のDMSO (15ml) 溶液を滴下し、滴下開始から1分後、Boc-Leu-H (アルデヒド) (4) (2.0 g, 9.3 mmol) のTHF (10 ml) 溶液を滴下した。滴下終了後、冷却を外し1時間攪拌した。
- 15 。反応液を冷水1000ml中に投入して反応終了し、酢酸エチルで抽出し、水、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、乾燥剤濾去後、濃縮して2.2gの粗精製物を得た。また、Boc-Leu-H (アルデヒド) (4) (4.58 g, 21.3 mmol) を同様の条件で反応し、4.81gの粗精製物 (5 a 及び 5 b) を得た。この反応2回分の粗製製品を合わせて、シリカゲルオープンカラム (酢酸エチル/ヘキサン=1/2) で精製した。収量5.6g (80%)。これをシリカゲルオープンカラム (トリクロロメタン/アセトン=100/1) で分離し、ジアステレオマーを精製して5 a、5 bをそれぞれ豊富に含む画分を回収した。ジアステレオマー 5 a、5 bの判別はNMRにより行なった。5 a リッチの画分 (5 a / 5 b = 5 / 1) を後の工程に用いた。
- 25 エポキシ化合物 5 a (0.96g, 4.2mmol) とマロン酸ジエチル (0.76ml, 1.2当量) をエタノール (脱水) 3mlに溶解後、氷冷下、20%ナトリウムエトキシド 2ml (3当量) を滴下した。冷却をはずし、室温で20時間攪拌後、冷10%クエン酸水溶液中へ投入して、反応終了した。酢酸エチルで抽出、水洗、飽和食塩水洗浄後

、無水硫酸ナトリウムで乾燥、乾燥剤濾去し、シリカゲルカラム（酢酸エチル／ヘキサン＝1／5）で精製して化合物6 aを得た。収量1.2g (83%)。

アルゴン気流下、化合物6 a (1.13g, 3.29mmol) を脱水エタノール10mlに溶解し、氷冷下、20%ナトリウムエトキシド (1.4ml, 1.2当量)、ヨウ化イソプロピル (1.8ml, 3当量) を加えた後、60℃にて5時間攪拌、室温で終夜攪拌、翌日60℃で7時間攪拌した。冷10%クエン酸水溶液へ投入して反応終了した。酢酸エチルで抽出し、有機層を洗浄後、硫酸ナトリウムを加えて乾燥、乾燥剤を濾去、溶媒を留去して粗生成物を得た。シリカゲルカラム (20g, 酢酸エチル／ヘキサン＝1／3) で精製して、目的物7を得た。収量0.8g (63%)。

10     ラクトン-エステル (7) (0.78g, 2.0mmol) をジオキサン約10mlに溶解。氷冷下、1N水酸化ナトリウム (4ml) を滴下後、室温にて攪拌した。

1.5時間攪拌後、ジオキサンを留去、冷0.2規定HCl水溶液へ投入、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥、濾過後、濃縮し、ラクトン-カルボン酸 (8) の粗精製物を得た。これをそのままトルエンに溶

15     解、95℃のオイルバス上で加熱する (3時間)、その後、終夜放冷、翌日再度95℃に加熱する。1.5時間後トルエンを留去、シリカゲルカラム（酢酸エチル／ヘキサン＝1／5）で精製した。生成物のTLC上近接した2つのスポット中、下方のスポットに対応する化合物 (9 a) 0.4g、及び上方のスポットに対応する化合物 (9 b) 0.2gを得た。それぞれ収率63%及び32%。

20     化合物9 a (0.37g, 1.18mmol) をジオキサン2.5mlに溶解、氷冷下、1規定水酸化ナトリウム溶液を滴下後、室温で2時間攪拌した。これに20%クエン酸水溶液を加えて反応を終了させ、酢酸エチルで抽出した。水次いで飽和食塩水で洗浄後、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過、濃縮してヒドロキシカルボン酸 (10) を得た。これを無水DMFに溶解して、イミダゾール (1.7g, 25mmol)、塩化t-ブチルジメチルシリル (1.8g, 12mmol) DMAP (25mg, 0.2mmol) を順次加えて、終夜室温にて攪拌した。これにメタノール約1mlを加えて30分攪拌して試薬を漬した後、20%クエン酸に投入、酢酸エチル抽出した。有機層を水洗、飽和食塩水洗浄し、硫酸ナトリウム乾燥後、濾過、濃縮した。これ (ジシリル体) を

-20-

酢酸に溶解して、室温で4時間攪拌し（TLC、及び反応液のMSより、シリルエステルの切断を確認）、酢酸を減圧留去後、シリカゲルカラム（酢酸エチル／ヘキサン＝1／2）で精製して、化合物11を得た。収量0.5g（96%）

〔化合物11の異性体の合成〕

- 5      また9bから上記と同様の処理により、シリル化合物11の異性体を得た。

収量0.2g（88%）

〔Leu-OMe塩酸塩の合成〕

- 脱水メタノール（150ml）をフラスコ中に入れ、冷却した（-15℃）。SOCl<sub>2</sub>（40ml）を滴下、10分後L-ロイシンを粉末のまま投入、冷却をはずし、室温にて  
10      攪拌した。約10分後脱水メタノールを100mlを追加して終夜攪拌した。20時間後、溶媒を減圧留去、メタノールフラッシュを2回した後、結晶性の残渣にジエチルエーテルを加えて沈殿を濾取、水酸化ナトリウム上で減圧乾燥した。収量24.23g（87.8%）

〔Boc-Met-Leu-OMeの合成〕

- 15      500mlコルベンにHCl, Leu-OMe（5.3g, 29.2mmol）, Boc-Met（7.64g, 30.6mmol）, 1-ヒドロキシー-1H-ベンゾトリアゾール（HOBt）（4.34g, 32mmol）を量りこみ、DMFに溶解した。冷却下、WSCD（5.88ml, 32mmol）を滴下した。2時間後、冷2%重曹水へ投入、析出した沈殿を濾取、水洗した。これを酢酸エチル300mlに溶解、0.2規定塩酸、水、飽和食塩水で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒  
20      を留去、析出した沈殿をヘキサンで濾取した。5酸化リン上で減圧乾燥して、目的物（13）を得た。収量10.4g（94.6%）。

〔脱Boc処理〕

- Boc-Met-Leu-OMe（1.09g, 2.89mmol）に冷却下TFAを加え、冷却下10分後、冷却をはずして室温にて50分攪拌した。TFAを留去、4.9規定塩酸／ジオキサン（0.71ml）を加えて、ヘキサンで数回デカント後、濃縮、減圧乾固して固体を得た。  
25      。収量0.8g（塩酸塩として90%）

〔縮合反応〕

上記塩酸塩（0.29g, 0.93mmol）に、化合物11（0.34g, 0.76mmol）と、HOOB

-21-

t (150mg, 0.92mmol) を加えて、DMF (10ml) に溶解した。冷却下WSCD (170 $\mu$ l, 0.93mmol) を滴下後、冷却をはずし、室温にて攪拌した。20時間後、冷2%重曹水へ投入して反応を終了し、酢酸エチルで抽出し、10%クエン酸、水、食塩水で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮、シリカゲルカラム（酢酸エチル／ヘキサン＝1／4）で精製し化合物14を得た。収量0.5g (93%)。

保護体14 (0.5g, 15-02011221) を脱水THFに溶解し、TBAF・3H<sub>2</sub>O (330mg, 1.05mmol) を加えて、室温で24時間攪拌することにより、脱シリル化した。THFを留去後、シリカゲルカラム（酢酸エチル／ヘキサン＝1／1～1／2）で精製。目的化合物（1）の粗精製品0.25g、原料回収0.14gを得た。逆相HPLC（YMC-ODS, アセトニトリル／水／0.1%TFA）で精製、凍結乾燥して目的物を得た。収量106mg (25%)。ESI-MS：590.3 (M+H, 理論値590.38), 612.3 (M+Na)

#### 〔化合物1の異性体の合成〕

前述の化合物11の異性体 (0.18g) を用いて、同様に縮合、脱保護、精製して化合物1の異性体46mgを得た。ESI-MS：590.3 (M+H, 理論値590.38), 612.3 (M+Na)

#### 〔実施例2〕 溶解性検討

実施例1において合成した化合物の溶解度を肉眼と顕微鏡により検討した。結果を次表に示す。

表1

#### 化合物の溶解性

溶 媒	濃 度 (10 ng/ml)	濃 度 (1 $\mu$ g/ml)	濃 度 (100 $\mu$ g/ml)
生理食塩水	+	+ / -	-
リン酸緩衝液 (PH 7.0)	+	+ / -	-
10%牛胎児血清を 含むDMEM培養液	+	+ / -	-
DMSO	+	+	+

+, 溶解; + / -, ほぼ溶解; -, 不溶

## 〔実施例 3〕 阻害活性の測定

本実施例に用いるヒトAPP695遺伝子（そのコード領域の塩基配列を配列番号 6 に示す。）は正常者の死後脳から通常の方法により作成し c DNAライブラリーからスクリーニングしたものであり、全塩基配列は通常の方法によってすべて確認

5 した。すなわち、凍結脳組織約 1 g をフェノール処理し、水溶液上清を得た。この操作を繰り返した後、エタノールにより mRNA 画分を沈殿させた。20 mM トリス塩酸 pH 8.0、0.1 mM EDTA により溶解後、オリゴ dT プライマーを用いて mRNA を鋳型にして逆転写酵素により c DNA を合成させた。RNase により残存 RNA を分解させた後、得られた一本鎖 c DNA を鋳型にして DNA ポリメラーゼにより 2 重鎖 c DNA を合

10 成させた。この後、T4 DNA ポリメラーゼによって 2 重鎖 c DNA を平滑化させた。EcoRI メチラーゼにより、EcoRI 制限酵素部位にメチル化させた後、EcoRI リンカーアダプターをリガーゼにより結合させた。ゲル濾過により非反応のフリーアダプターを除去した後に、ラムダ gt11 ベクターと DNA リガーゼにより結合させたものをパッケージングキットによりラムダファージへ組み込んだ。得られたラムダフ

15 アージ混合物を寒天プレートの大腸菌に感染させ、増幅させたファージ液を c DNA ライブラリーとした。APP c DNA のクローニングには、アミロイドタンパク質から類推されるオリゴヌクレオチドを  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP を用いて DNA キナーゼにより放射性標識しておき、この標識ヌクレオチドをプローブとして、 $10^6$  pfu (plaque forming units) のファージを寒天上でプラーク形成させてから、ナイロン膜に接

20 触させた。このナイロン膜をアルカリ処理することにより、膜に結合したファージ DNA を 1 本鎖に変性させてから、中和しておき、ここに、鮭精子 DNA を含む溶液で保温した後に、 $^{32}\text{P}$  放射能標識した標識ヌクレオチドプローブを加え、12 時間ハイブリダイズ反応させた。ここで目的とするファージに組み込んだ APP 遺伝子とオリゴヌクレオチドが相補的な塩基配列をしたものは、2 重鎖として形成され

25 る。このナイロン膜をエックス線フィルムに接触させ、感光部に対応する寒天上のプラークを APP 遺伝子（断片）を含むファージとした。この操作を繰り返すことにより、最終的に単一のファージを得た。ファージに組み込まれたから APP 遺伝子の塩基配列は、公知のサンガー法によって決定した。



サル腎臓由来の培養細胞株であるCOS細胞に、外部からAPP遺伝子をリポフェクタミンプラス試薬（インビトロゲン（株））を用いて試薬プロトコールに従い、効率よく細胞内導入した。すなわち、APP遺伝子1 $\mu$ gを100 $\mu$ lのOPTI-MEMに溶解し、プラス試薬6 $\mu$ lと混合してから室温で15分放置させた。平行してやはり100 $\mu$ lのOPTI-MEM培地に溶解した4 $\mu$ lのリポフェクトアミンを調製しておき、これとAPP遺伝子溶液とを混合してから、さらに15分室温放置した。あらかじめ10%牛胎児血清を含むDMEM培養液を含む培養液で75%から80%細胞密度で培養したCOS細胞の培養液をOPTI-MEM培地に培地交換し、この各800 $\mu$ lを加えた6穴培養プレートを用意しておき、各培養ウェルに遺伝子を含む200 $\mu$ lの反応液を加えた。遺伝子導入の12時間後に、培地を、導入遺伝子反応液を含むOPTI-MEM培地から、導入遺伝子を含有しない10%牛胎児血清を含むDMEM培養液に交換した。この培養液に実施例1で得た化合物を添加し、36から48時間後の培養液上清を得、遠心チューブに移し、室温で10,000rpm回転、5分間遠心した遠心上清をアミロイドタンパク質を含む検体とした。各検体に含まれる短いアミロイドタンパク質成分と長いアミロイドタンパク質成分は市販のアミロイドタンパク質測定ELISAキット（KHB3441: Signal Select™ Human  $\beta$  Amyloid1-42 ELISA KitあるいはKHB3481: Signal Select™ Human  $\beta$  Amyloid1-40 ELISA Kit, BioSource International, Inc. CA, USA）によって別個に測定することができる。このアミロイド測定ELISAキットには、あらかじめ2種類のアミロイドタンパク質に対する1次抗体を塗布してある96穴ELISAプレートが用意されており、非特異的な通常のブロック反応をさせて非特異的な抗原抗体反応を消去してから、測定しようとするアミロイドタンパク質を含む培養液検体を反応させた。その後、通常の洗浄操作を経て、2次抗体を加えた。この2次抗体は2種類のアミロイドタンパク質を区別する2種類の抗体であり、一方は短いアミロイドタンパク質、他方は長いアミロイド抗体を識別し、両者の交差反応はない。両アミロイドタンパク質の違いはカルボキシル末端のアミノ酸2残基（イソロイシンとアラニン）の有無であり、前者を識別する抗体はアミロイドタンパク質のカルボキシル末端のバリンを、後者を識別する抗体はアラニンを特異的に認識すると考えられる。

-24-

該キットを使用したアミロイドタンパク質の測定結果を次表で示す。

表 2

化合物の阻害活性 - 1

		DMSO			阻害剤 (100 $\mu$ M)		
		A $\beta$ 42(43) (pg/ml)	A $\beta$ 40 (pg/ml)	A $\beta$ 42(43)/ A $\beta$ 40 比	A $\beta$ 42(43) (pg/ml)	A $\beta$ 40 (pg/ml)	A $\beta$ 42(43)/ A $\beta$ 40 比
1	偽処置	0	0	—	0	0	—
2	APP695 野生型	1415	9656	0.147	415	218	1.90
3	APP695 ロンドン型	2845	6623	0.430	855	151	5.66
4	APP695 スウェーデン型	2503	17002	0.147	1311	1726	0.76

5

表 3

化合物の阻害活性 - 2

		阻害率 (%)		
		A $\beta$ 42(43)	A $\beta$ 40	総A $\beta$
1	偽処置	—	—	—
2	APP695 野生型	71	98	98
3	APP695 ロンドン型	70	98	89
4	APP695 スウェーデン型	48	90	84

表 1, 2 からわかるように本阻害剤は、A $\beta$ 42(43)の産生については約71%、  
 10 A $\beta$ 40の産生については約98%とほぼ100%に近い阻害活性を示した。アミロイ

ドタンパク質全量でも約98%の阻害を示すことから、本阻害剤は有効な活性を示すことが明らかになった。

- 全アルツハイマー病の数%と症例数の少ない疾患ではあるが家族性早期発症型アルツハイマー病について、アミロイドタンパク質の産生に対する阻害効果も検討した。それによると、ロンドン変異と呼ばれるAPPのVal717Ile変異では、野生型配列の場合とほぼ同等の阻害効果が得られた。一方、スウェーデンで発見された変異であるMet670Arn、Lys671Leuの2重変異では、A $\beta$ 40に対する阻害活性は約90%、A $\beta$ 42(43)に対する阻害活性は約48%であった。いずれの家族性疾患型変異を持つ場合にも、総アミロイドタンパク質の産生については約80%をこえる阻害活性が認められた。

#### 〔実施例4〕 阻害活性の測定

- 実施例3では、ヒトAPPのフルサイズ遺伝子を使用している。アミロイドタンパク質は、APPの $\alpha$ もしくは $\beta$ セクレターゼの第1段階と $\gamma$ セクレターゼの第2段階からなるタンパク質分解によって形成されるが、 $\gamma$ セクレターゼ以外の第1段階での阻害によってもアミロイドタンパク質の産生が抑制される。本発明の化合物の阻害効果が( $\beta$ セクレターゼの阻害によるものでなく) $\gamma$ セクレターゼの阻害によるものであることを直接的に証明するため、第1段階で切除されるポリペプチド部分を予め欠いたAPP人工断片(C100という)をAPP695の代わりに使用するほかは、実施例4と同様の方法で実験を行なって、生成したアミロイドタンパク質を測定した。結果を次の表に示す。

表 4

化合物の阻害活性 - 3

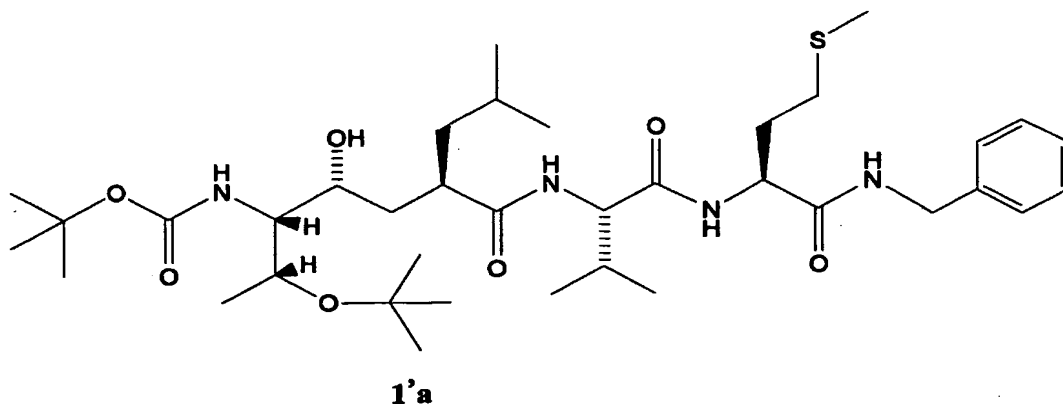
		DMSO			阻 害 剤 (100 $\mu$ M)			阻 害 率 (%)		
		A $\beta$ 42(43) (pg/ml)	A $\beta$ 40 (pg/ml)	総A $\beta$ (pg/ml)	A $\beta$ 42(43) (pg/ml)	A $\beta$ 40 (pg/ml)	総A $\beta$	A $\beta$ 42(43)	A $\beta$ 40	総A $\beta$
1	C100	127	944	1071	62	100	162	51	89	85

C-100のAPP（野生型）を用いた結果では、スウェーデン型変異とほぼ同様の阻害活性を示した。すなわち、A $\beta$ 40への阻害活性が約90%、A $\beta$ 42(43)への阻害活性は約50%であった。いずれの家族性疾患型変異を持つ場合にも、総アミロイ

5 ドタンパク質の産生については約80%をこえる阻害活性が認められた。

〔実施例5〕 化合物t-But-OCO-Thr\*-Leu-Val-Met-NH-Bzlの合成

図7～図12に示す合成経路に従って、t-But-OCO-Thr\*-Leu-Val-Met-NH-Bzl  
〔式中「\*」は、ThrとLeuとの間のペプチド結合「-CO-NH-」がドロキシ  
エチレン基「-CHOH-CH<sub>2</sub>-」に置き換えられていること及びThrのヒド  
10 ロキシル基がt-ブチルエーテル化されていることを示す。〕を以下のようにし  
て合成した。該化合物において、該ヒドロキシエチレン基の $\alpha$ 炭素周りの立体配  
置落としてはR型、S型の双方を合成した。それらの化合物の構造式のうち、R  
型のものを式(1a)に示す。



15

アルデヒド3'の合成：

2'のDCHA塩(49.5 g, 100.88 mmol) (Bachem123400)を酢酸エチル(500 ml)に溶解、20%クエン酸水溶液(500 ml)で脱塩、有機層を水洗(3回)、飽和食塩水で洗浄後、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥、乾燥剤を濾去後、濃縮して油状物を得た。これを、脱水THF(500 ml)に溶解、-15℃に冷却し、クロロ炭酸イソブチル(15.7 ml, 121 mmol)を滴下した。-15℃で10分間攪拌後、NaBH<sub>4</sub>を加え、-15℃で10分

20

攪拌し、その後-50℃に冷却してメタノール (500 ml) を滴下した。1 N塩酸 (200 ml) を滴下後、室温に戻るに任せて30分間攪拌した。溶媒を留去後、酢酸エチルで抽出し、0.2N塩酸、水で3回、飽和食塩水で順次洗浄した後、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥し、溶媒を留去してアルコール体を得た (39 g)。アルコール体39gを3  
5 回に分けて、13gずつ酸化反応に付した。すなわち、Z-Thr (tBu)-ol (13 g, 33 mmol) をトルエンに溶解、留去を2回行なった後、脱水DMSO (120 ml) に溶解、トリエチルアミン (13.9 ml, 100 mmol) を加えて15℃の水浴で冷却した。別のフラスコにて三酸化硫黄ピリジン錯体 (15.9 g, 100 mmol) をDMSO (70 ml) に溶解してZ-Thr (tBu)-ol溶液に二分間で滴下した。15℃水浴で8分攪拌し、氷水中へ投入  
10 して反応終了し、酢酸エチルで抽出した。残りのアルコール体も同様に反応に付き、酢酸エチル抽出液を全て合わせて、水、次いで飽和食塩水で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥し、濃縮後、シリカゲルカラム (AcOEt/Hex=1/4) で精製して目的のアルデヒド (3') を得た。収量24.1 g (カルボン酸から81%)。

エポキシ化物 (4') の合成:

15 アルデヒド (3') を半量ずつ、2回に分けて反応に付した。水素化ナトリウム (62.6 % in Oil) 1.9gにDMSO (脱水、200ml) を加え50℃に加温し、1時間攪拌した。生成したジムシルアニオン溶液にTHF (脱水、200 ml) を加えて氷冷し、これに $(\text{CH}_3)_3\text{SiI}$  (10 g, 49 mmol) のDMSO (50ml) 溶液を滴下し (滴下20秒)、滴下開始から1分後、Z-Thr (tBu)-H (12.0 g, 40.9 mmol) のTHF (510 ml) 溶液  
20 を滴下した (滴下1分)。滴下終了後、室温 (20℃) にて1時間攪拌し、冷水1500 ml中に投入して反応終了した。酢酸エチルで抽出し、水、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濃縮して10 gの粗精製物を得た。同様に2回目の反応をして、10 gの粗精製品を得、反応2回分を合わせて、シリカゲルカラム (AcOEt/Hex=1/2) で精製、更に再度シリカゲルカラム (AcOEt/Hex=1/4) 精製を  
25 して目的のエポキシ化物 (4') を得た。6.3 g (25%)。

化合物 (5') の合成:

エポキシ化合物 (4') (6.3 g, 20.5 mmol) を脱水エタノール (10 ml) に溶解し、マロン酸ジエチル (3.8 ml, 25 mmol) を加えて、氷冷した。氷冷下、20% N

aOEt (9.6 ml, 24.5 mmol) を滴下し、3時間攪拌後、10%クエン酸水を加えて酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を水、次いで飽和食塩水で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥させた後、濃縮し、シリカゲルカラム (AcOEt/Hex=1/2) で精製して (5') を得た。収量7.66 g (89%)。

5 化合物 (6') の合成：

エチルエステル5' (7.38 g, 17.5 mmol) をメタノール (35 ml) に溶解し、氷冷下1N NaOH (35 ml) を滴下した。室温にて2時間攪拌後、20%クエン酸水溶液に投入し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水及び飽和食塩水洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮した。これをトルエン (50 ml) に溶解してオイルバス上で90  
10 °Cに加熱し、6時間後にトルエンを減圧留去し、シリカゲルカラム (AcOEt/Hex=1/2) で精製して化合物 (6') を得た。収量0.95 g (エチルエステルから15.5 % )  
。

化合物 (7') の合成：

ラクトン化合物 (6') (0.95 g, 2.72 mmol) を脱水THF (20 ml) に溶解し、  
15 78°Cに冷却、1.1N LiHMDS (5.4 ml) を滴下し、-78°Cで30分攪拌後、3ブromo 2  
メチルプロペン (550  $\mu$ l, 5.45 mmol) を加えて-78°Cで40分攪拌した。飽和塩化ア  
ンモニウム水溶液を加えて反応終了し、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗  
浄、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥させ、シリカゲルカラムで精製して、目的アルケン (7') を  
0.29 g原料回収を0.17g得た。回収原料を同様の当量数で再度反応し、後処理、  
20 精製して、1回目と合わせた。収量0.37 g (34 %)

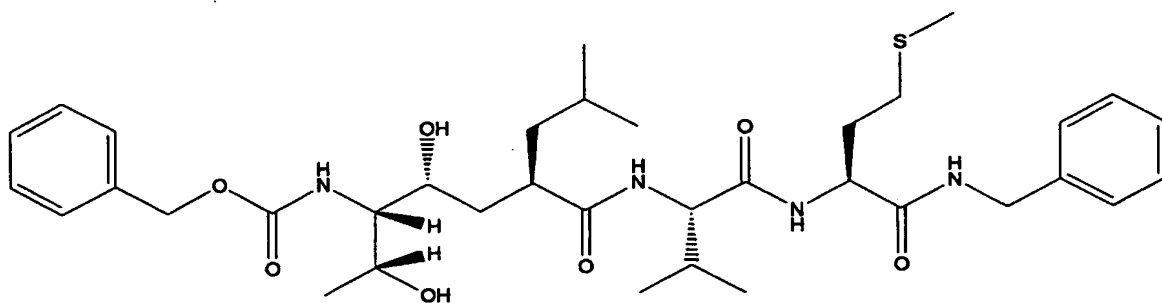
化合物 (8') の合成：

アルケン (7') (0.37 g, 0.92 mmol) をメタノール (10ml) に溶解し、5% P  
d-Cを加えて水素を導入して接触還元を行なった。4時間後、窒素を導入して反応  
終了させた。触媒を濾去し濃縮後、メタノール (20ml) に溶解させ、トリエチル  
25 アミン (TEA) (256  $\mu$ l, 1.84 mmol)、 $\text{Boc}_2\text{O}$  (400 mg, 1.84 mmol) の順に加え  
て室温で終夜攪拌した。濃縮後シリカゲルカラム (AcOEt/Hex=1/4) で精製して  
目的物 (8') を得た。収量0.48 g。

化合物 (9')、(10')、1' b、11'、1' a) の合成：

-29-

- ラクトン (8') をメタノール中、水酸化ナトリウムでケン化した。これを酸析、抽出後、DMF中でアルキルシリルクロリド、イミダゾール、DMAPでシリルエーテル化、シリカゲルカラムで精製してカルボン酸 (9') を得た。カルボン酸 (9') と、アミノ成分 (ジペプチドH-Val-Met-NHBzl) を、DMF溶媒中でEDCとH
- 5 OBtを用いて縮合させ、反応終了後、抽出、洗浄等の後処理を行ないシリカゲルカラムで精製して (10') を得た。シリルエーテル (10) をTHF溶媒中、TBAF処理を行なった。反応終了後、濃縮、シリカゲルカラムとODS-HPLCを組み合わせ精製し (1'b : TLVM-2) を得た。これを、DMSO溶媒中、三酸化硫黄ピリジン錯体とトリエチルアミンを用いてSwern酸化に付した。抽出等の後処理の後、
- 10 副生した硫酸エステル等をODS-HPLC分取により除去して、ケトン化合物 (11') が得られた。このケトン (11') をメタノールに溶解させ、NaBH<sub>4</sub>で還元してアルコール体とした。この還元反応で、(1'a) と (1'b) の混合物が得られるが、ODS-HPLCで容易に分離可能であったので、HPLC分取を行ない精製して (1'a : TLVM-2) を得た。
- 15 なお、このものについて保護基の脱離とZ基による置換を経て、あるいは、合成途中の適宜の段階でt-ブトキシカルボニル基をZ基に交換しておいて同様に合成を進めた後、t-ブチル基を外すことによって、次の化合物も得られる。



Z-T\*LVM-NHBzl

20

上記で得られた化合物（1' a）及び（1' b）について、実施例 3 と同様の方法により阻害活性の測定を行った。但し、評価系としては、スウェーデン変異を導入したヒト A P P 6 9 5 遺伝子をヒト由来神経系細胞株 I M R 3 2 に導入したものをを用いた。結果を表 5 に示す。

5

表 5

		A $\beta$ 40 (pg/ml)	阻害率 (%)
化合物 1' a	100 $\mu$ M	0	100
	10 $\mu$ M	31	73
化合物 1' b	100 $\mu$ M	26	78
	10 $\mu$ M	72	38

#### 産業上の利用可能性

本発明はアルツハイマー病およびその類縁疾患の病態に関する新規なペプチド模倣化合物を提供するものであり、この特性を利用した新規医薬組成物、診断手段の提供は本化合物が関与する疾患、特にアルツハイマー病およびその類縁疾患の臨床、異様領域において有用である。

10



## 請 求 の 範 囲

1. アミノ酸配列Val-Val-Ile-Ala-Thr-Val-Ile-Val-Ile-Thr-Leu-Val-Met-Leu-Lys-Lys-Lys（配列番号1）において、第11番目のLeuを含む連続した少なくとも3個のアミノ酸よりなるアミノ酸配列よりなり、該Leuとその直前及び／又は直後に位置するアミノ酸との間において、ペプチド結合-CO-NH-に代えてヒドロキシエチレン基-CHOH-CH<sub>2</sub>-を有し、他のアミノ酸間の結合はペプチド結合であり、且つN末端に、フェニル基又はナフチル基で置換されていてよい炭素数1～10のアルキルに基づくアルキルオキシカルボニル基を有し、C末端が、フェニル基又はナフチル基で置換されていてよい炭素数1～10のアルキルによるアルキルエステル化又はアルキルアミド化されており、第10番目のThrのヒドロキシル基の水素が炭素数1～4の疎水性基又はZ基により置換されていてもよいものであることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩。

2. 請求項1の化合物において、該アミノ酸配列の第14番目のLeuがIleであってよい疎水性アミノ酸又はProで置換され、第11番目のLeuが、Ileであってよい疎水性アミノ酸で置換され、又は第10番目のThrがSerで置換され、又は第9番目のIleが、Leuであってよい疎水性アミノ酸で置換されていることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩。

3. アミノ酸配列Ile-Thr-Leu-Val-Met-Leu（配列番号2）において、第3番目のLeuを含む連続した3、4、5又は6個のアミノ酸よりなるアミノ酸配列よりなり、該Leuとその直前及び／又は直後に位置するアミノ酸との間において、ペプチド結合-CO-NH-に代えてヒドロキシエチレン基-CHOH-CH<sub>2</sub>-を有し、他のアミノ酸間の結合はペプチド結合であり、且つN末端に、フェニル基又はナフチル基で置換されていてよい炭素数1～10のアルキルに基づくアルキルオキシカルボニル基を有し、C末端が、フェニル基又はナフチル基で置換されていてよい炭素数1～10のアルキルによるアルキルエステル化又はアルキルアミド化されており、Thrのヒドロキシル基の水素が炭素数1～4の

疎水性基又はZ基により置換されていてもよいものであることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩。

4. アミノ酸配列Leu-Val-Met-Leu（配列番号3）において、第1番目のLeuと第2番目のValと間において、ペプチド結合-CO-NH-に代えてヒドロキシエチレン基-CHOH-CH<sub>2</sub>-を有し、他のアミノ酸残基間の結合はペプチド結合であり、且つN末端に、フェニル基又はナフチル基で置換されていてよい炭素数1～10のアルキルに基づくアルキルオキシカルボニル基を有し、C末端が、フェニル基又はナフチル基で置換されていてよい炭素数1～10のアルキルによるアルキルエステル化又はアルキルアミド化されていることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩。

5. アミノ酸配列Thr-Leu-Val-Met（配列番号4）において、第1番目のThrと第2番目のLeuとの間において、ペプチド結合-CO-NH-に代えてヒドロキシエチレン基-CHOH-CH<sub>2</sub>-を有し、他のアミノ酸間の結合はペプチド結合であり、且つN末端に、フェニル基又はナフチル基で置換されていてよい炭素数1～10のアルキルに基づくアルキルオキシカルボニル基を有し、C末端が、フェニル基又はナフチル基で置換されていてよい炭素数1～10のアルキルによるアルキルエステル化又はアルキルアミド化されており、Thrのヒドロキシル基の水素が炭素数1～4の疎水性基又はZ基により置換されていてもよいものであることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩。

6. 請求項3の化合物であって、Valの直前に位置するLeuが、Ileであってよい疎水性アミノ酸により置換され、又はN末端のLeuがIleであってよい疎水性アミノ酸若しくはProにより置換されていることを特徴とする化合物及びその薬剤学的に許容し得る塩。

7. 請求項4の化合物であって、Valの直前に位置するLeuが、Ileであってよい疎水性アミノ酸により置換され、又はN末端のLeuがIleであってよい疎水性アミノ酸若しくはProにより置換されていることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩。

8. 請求項5の化合物であって、Valの直前に位置するLeuが、Ileで

あってよい疎水性アミノ酸により置換されていることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩。

9. 請求項3の化合物であって、ThrがSerにより置換されていることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩。

10. 請求項3の化合物であって、Ileが、Leuであってよい疎水性アミノ酸により置換されていることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩。

11. 請求項5の化合物であって、ThrがSerにより置換されていることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩。

12. 請求項1ないし11の何れかの化合物であって、該アルキルオキシカルボニル基がBoc基であることを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩。

13. 請求項1ないし12の何れかの化合物において、アルキルオキシカルボニル基の代わりにTyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg（配列番号5）よりなるポリペプチドを融合して有することを特徴とする化合物又はその薬剤学的に許容し得る塩。

14. 請求項1ないし13の何れかの化合物を含んでなるガンマセクレターゼ阻害剤。

15. 請求項1ないし13の何れかの化合物に対する抗体。

16. アミロイドタンパク質生成阻害薬のスクリーニングにおける請求項1ないし13の何れかの化合物の、ガンマセクレターゼ阻害剤としての使用。

。

1 / 6

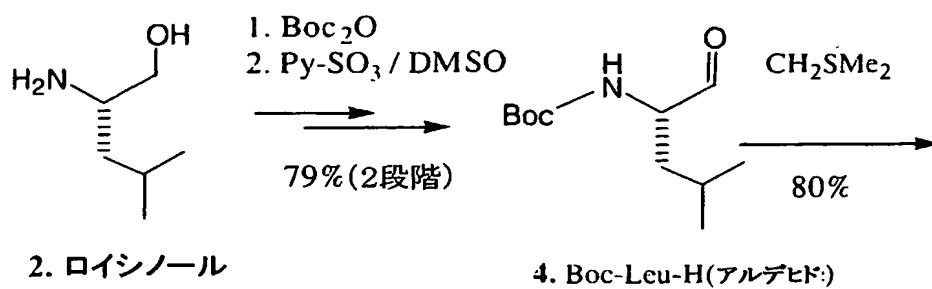


図 1

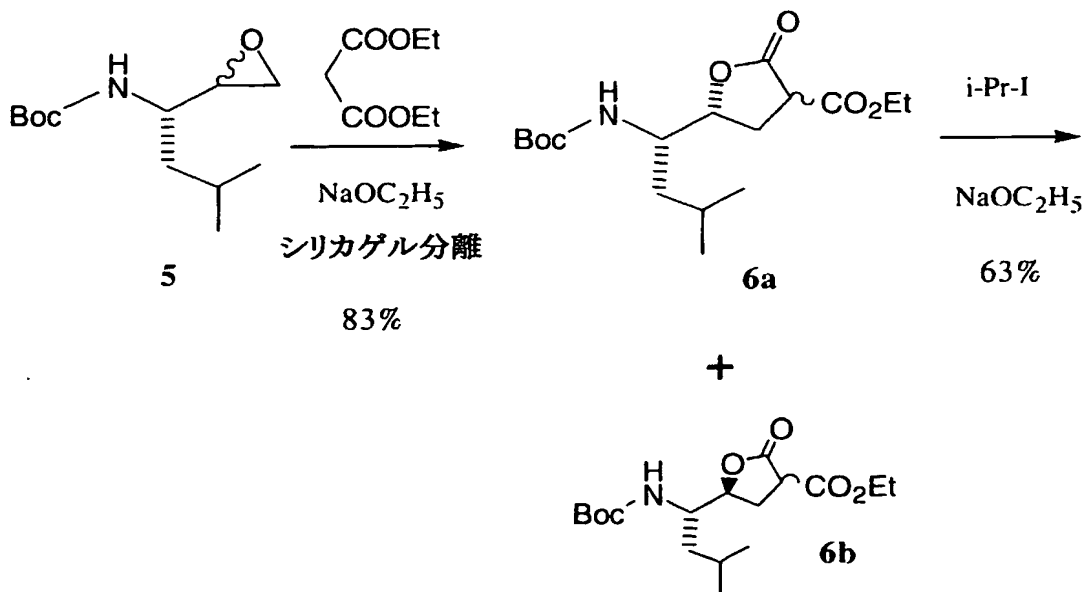


図 2

2 / 6

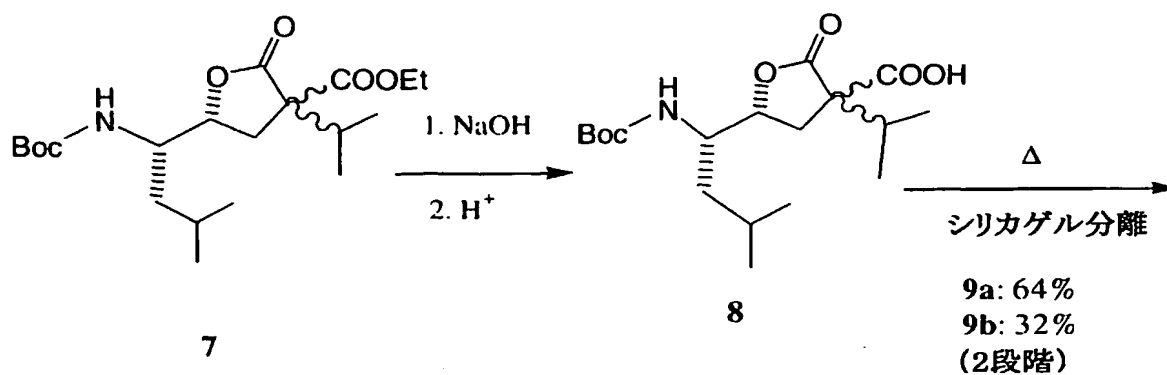


図 3

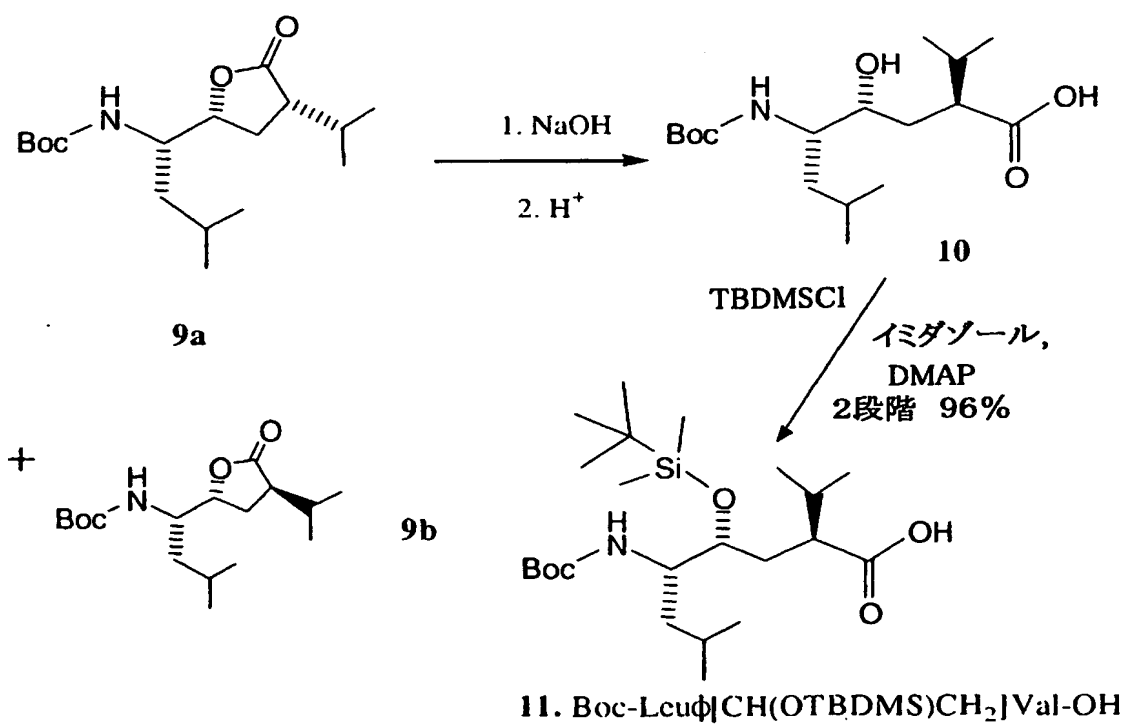


図 4

3 / 6

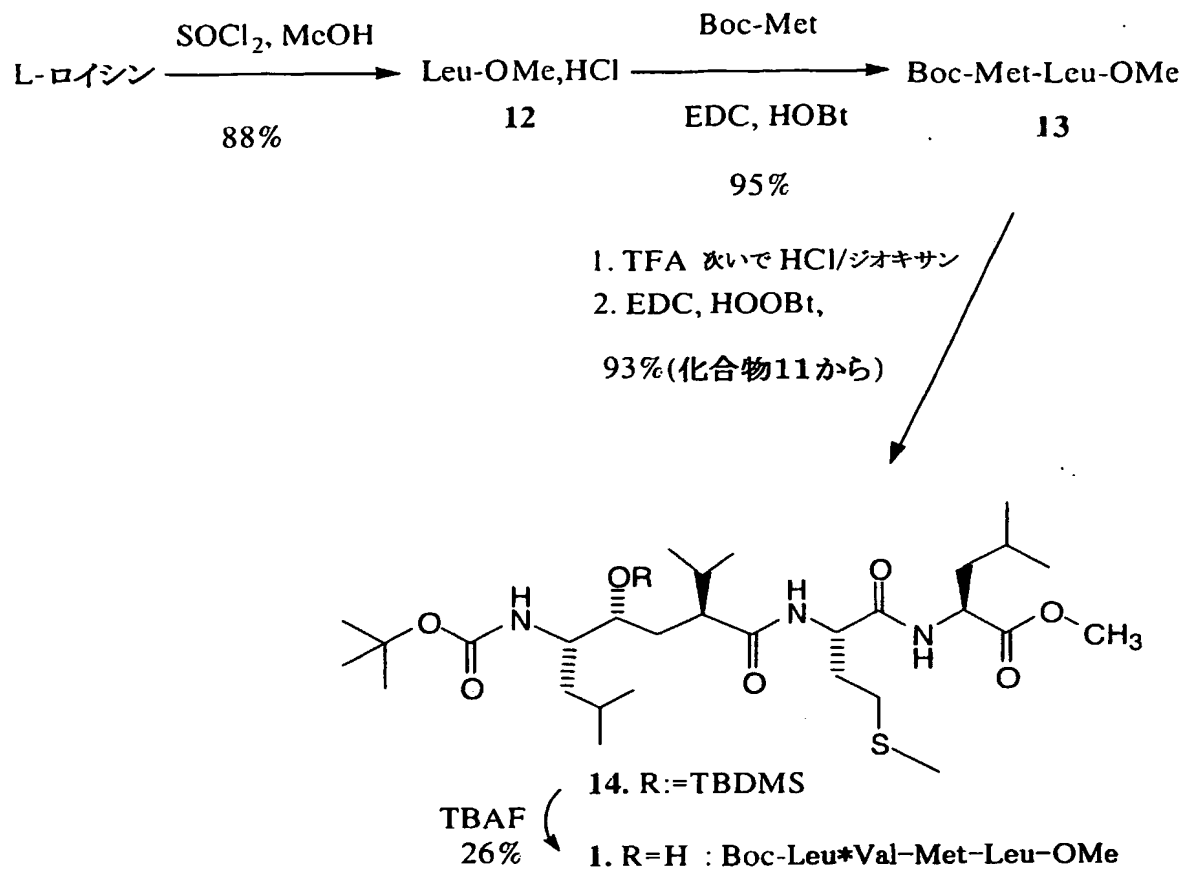


図 5

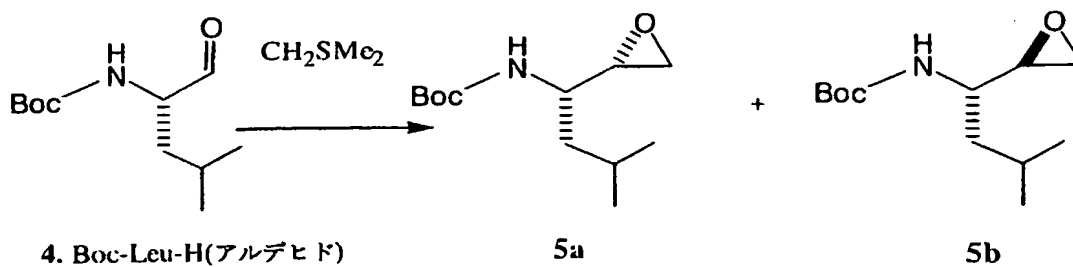


図 6

4 / 6

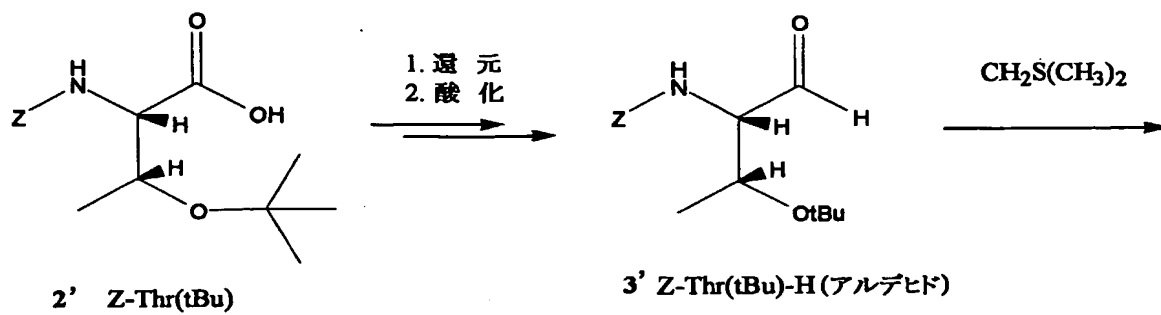


図 7

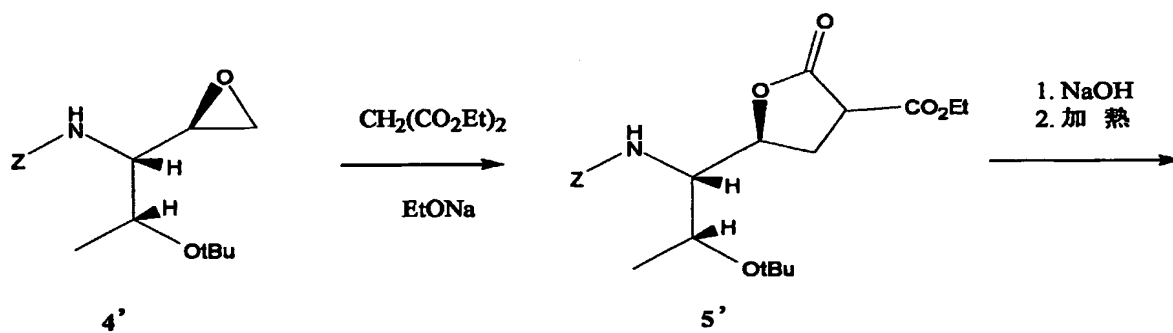


図 8

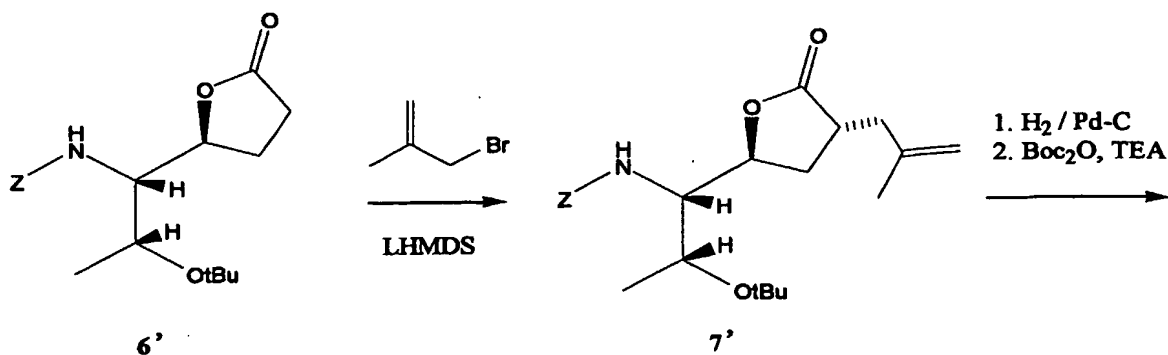


図 9

5 / 6

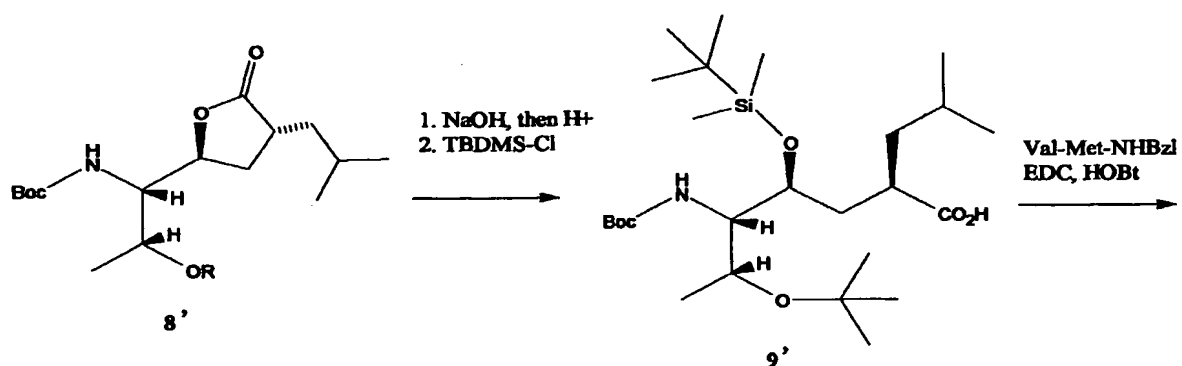
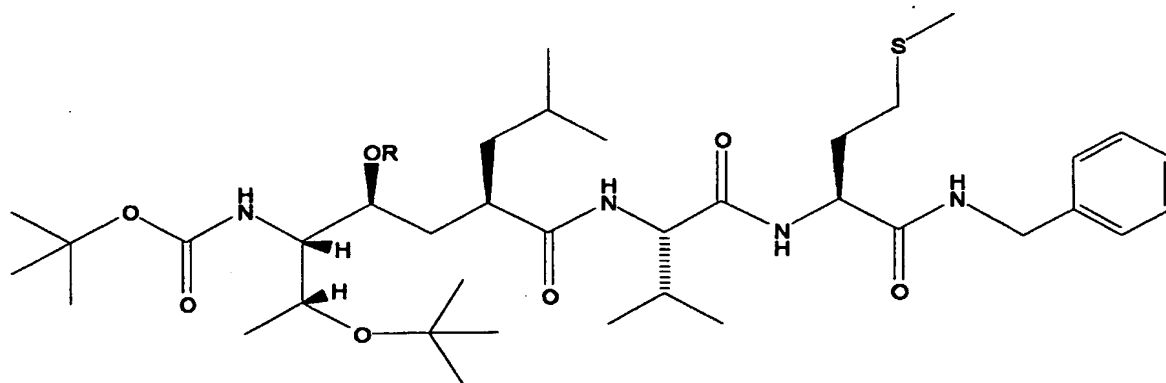


图 10



TBAF (  $\begin{matrix} 10' \\ 1'b \end{matrix}$  )  $\begin{matrix} R = \text{TBDMS} \\ R = \text{H (TLVM-2)} \end{matrix}$

图 11



6 / 6

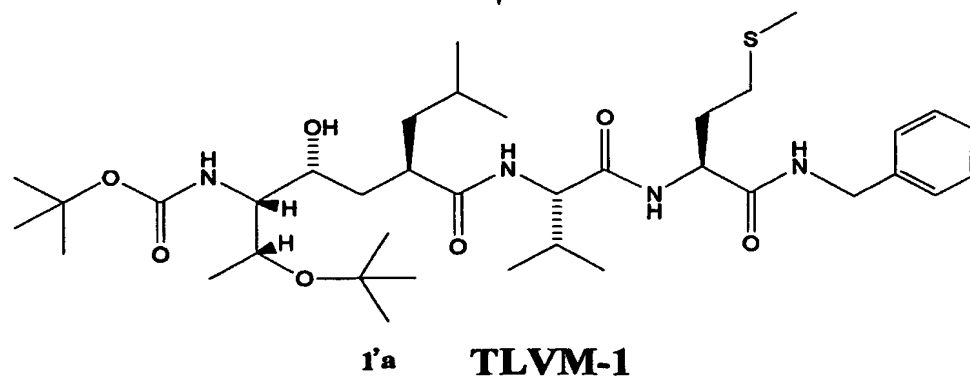
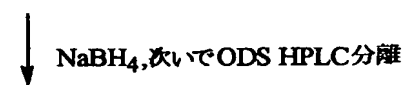
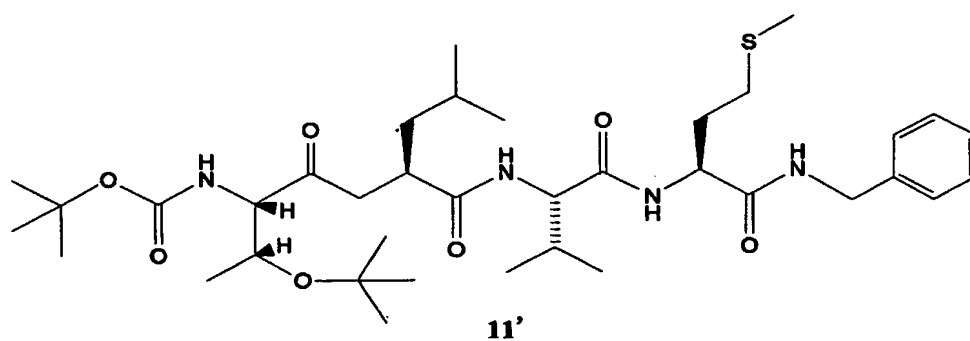
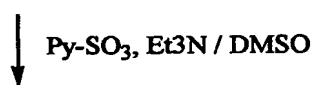
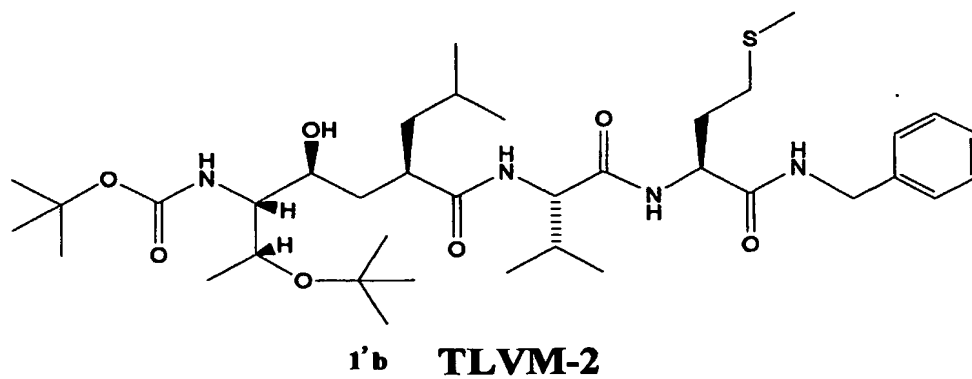


図 1 2

## SEQUENCE LISTING

<110> Hiroshi MORI

<120> Gamma-secretase Inhibitor

<130> GP59-PCT

<150> JP 2002-121983

<151> 2002-04-14

<160> 13

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys  
1 5 10 15

Lys

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Thr Leu Val Met Leu  
1 5

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Leu Val Met Leu

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Thr Leu Val Met

<210> 5  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

<210> 6  
<211> 2088  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 6

atg ctg ccc ggt ttg gca ctg ctc ctg ctg gcc gcc tgg acg gct cgg 48  
Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg  
1 5 10 15

gcg ctg gag gta ccc act gat ggt aat gct ggc ctg ctg gct gaa ccc 96  
Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro  
20 25 30

cag att gcc atg ttc tgt ggc aga ctg aac atg cac atg aat gtc cag 144  
Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln  
35 40 45

aat ggg aag tgg gat tca gat cca tca ggg acc aaa acc tgc att gat	192
Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp	
50 55 60	
acc aag gaa ggc atc ctg cag tat tgc caa gaa gtc tac cct gaa ctg	240
Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu	
65 70 75 80	
cag atc acc aat gtg gta gaa gcc aac caa cca gtg acc atc cag aac	288
Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn	
85 90 95	
tgg tgc aag cgg ggc cgc aag cag tgc aag acc cat ccc cac ttt gtg	336
Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val	
100 105 110	
att ccc tac cgc tgc tta gtt ggt gag ttt gta agt gat gcc ctt ctc	384
Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu	
115 120 125	
gtt cct gac aag tgc aaa ttc tta cac cag gag agg atg gat gtt tgc	432
Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys	
130 135 140	
gaa act cat ctt cac tgg cac acc gtc gcc aaa gag aca tgc agt gag	480
Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu	
145 150 155 160	
aag agt acc aac ttg cat gac tac ggc atg ttg ctg ccc tgc gga att	528

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile

165

170

175

gac aag ttc cga ggg gta gag ttt gtg tgt tgc cca ctg gct gaa gaa  
Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu

576

180

185

190

agt gac aat gtg gat tct gct gat gcg gag gag gat gac tcg gat gtc  
Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val

624

195

200

205

tgg tgg ggc gga gca gac aca gac tat gca gat ggg agt gaa gac aaa  
Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys

672

210

215

220

gta gta gaa gta gca gag gag gaa gaa gtg gct gag gtg gaa gaa gaa  
Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu

720

225

230

235

240

gaa gcc gat gat gac gag gac gat gag gat ggt gat gag gta gag gaa  
Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu

768

245

250

255

gag gct gag gaa ccc tac gaa gaa gcc aca gag aga acc acc agc att  
Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile

816

260

265

270

gcc acc acc acc acc acc acc aca gag tct gtg gaa gag gtg gtt cga  
Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg

864

275

280

285

ggt cct aca aca gca gcc agt acc cct gat gcc gtt gac aag tat ctc	912
Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu	
290 295 300	
gag aca cct ggg gat gag aat gaa cat gcc cat ttc cag aaa gcc aaa	960
Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys	
305 310 315 320	
gag agg ctt gag gcc aag cac cga gag aga atg tcc cag gtc atg aga	1008
Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg	
325 330 335	
gaa tgg gaa gag gca gaa cgt caa gca aag aac ttg cct aaa gct gat	1056
Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp	
340 345 350	
aag aag gca gtt atc cag cat ttc cag gag aaa gtg gaa tct ttg gaa	1104
Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu	
355 360 365	
cag gaa gca gcc aac gag aga cag cag ctg gtg gag aca cac atg gcc	1152
Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala	
370 375 380	
aga gtg gaa gcc atg ctc aat gac cgc cgc cgc ctg gcc ctg gag aac	1200
Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn	
385 390 395 400	
tac atc acc gct ctg cag gct gtt cct cct cgg cct cgt cac gtg ttc	1248

Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe	
405 410 415	
aat atg cta aag aag tat gtc cgc gca gaa cag aag gac aga cag cac	1296
Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His	
420 425 430	
acc cta aag cat ttc gag cat gtg cgc atg gtg gat ccc aag aaa gcc	1344
Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala	
435 440 445	
gct cag atc cgg tcc cag gtt atg aca cac ctc cgt gtg att tat gag	1392
Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu	
450 455 460	
cgc atg aat cag tct ctc tcc ctg ctc tac aac gtg cct gca gtg gcc	1440
Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala	
465 470 475 480	
gag gag att cag gat gaa gtt gat gag ctg ctt cag aaa gag caa aac	1488
Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn	
485 490 495	
tat tca gat gac gtc ttg gcc aac atg att agt gaa cca agg atc agt	1536
Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser	
500 505 510	
tac gga aac gat gct ctc atg cca tct ttg acc gaa acg aaa acc acc	1584
Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr	
515 520 525	



gtg gag ctc ctt ccc gtg aat gga gag ttc agc ctg gac gat ctc cag	1632
Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln	
530 535 540	
ccg tgg cat tct ttt ggg gct gac tct gtg cca gcc aac aca gaa aac	1680
Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn	
545 550 555 560	
gaa gtt gag cct gtt gat gcc cgc cct gct gcc gac cga gga ctg acc	1728
Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr	
565 570 575	
act cga cca ggt tct ggg ttg aca aat atc aag acg gag gag atc tct	1776
Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser	
580 585 590	
gaa gtg aag atg gat gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt	1824
Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val	
595 600 605	
cat cat caa aaa ttg gtg ttc ttt gca gaa gat gtg ggt tca aac aaa	1872
His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys	
610 615 620	
ggt gca atc att gga ctc atg gtg ggc ggt gtt gtc ata gcg aca gtg	1920
Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val	
625 630 635 640	
atc gtc atc acc ttg gtg atg ctg aag aag aaa cag tac aca tcc att	1968

Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile  
 645 650 655

cat cat ggt gtg gtg gag gtt gac gcc gct gtc acc cca gag gag cgc 2016  
 His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg  
 660 665 670

cac ctg tcc aag atg cag cag aac ggc tac gaa aat cca acc tac aag 2064  
 His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys  
 675 680 685

ttc ttt gag cag atg cag aac tag 2088  
 Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn  
 690 695

<210> 7

<211> 695

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg  
 1 5 10 15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro  
 20 25 30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln

35

40

45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp

50

55

60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu

65

70

75

80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn

85

90

95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val

100

105

110

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu

115

120

125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys

130

135

140

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu

145

150

155

160

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile

165

170

175

Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu

180

185

190

Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val

195	200	205
Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys		
210	215	220
Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu		
225	230	235 240
Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu		
	245	250 255
Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile		
	260	265 270
Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg		
	275	280 285
Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu		
	290	295 300
Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys		
305	310	315 320
Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg		
	325	330 335
Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp		
	340	345 350
Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu		
	355	360 365

Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala  
370 375 380

Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn  
385 390 395 400

Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe  
405 410 415

Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His  
420 425 430

Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala  
435 440 445

Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu  
450 455 460

Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala  
465 470 475 480

Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn  
485 490 495

Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser  
500 505 510

Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr  
515 520 525

Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln  
530 535 540

Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn  
545 550 555 560

Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr  
565 570 575

Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser  
580 585 590

Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val  
595 600 605

His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys  
610 615 620

Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val  
625 630 635 640

Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile  
645 650 655

His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg  
660 665 670

His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys  
675 680 685

Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn

690

695

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 2313

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

atg ctg ccc ggt ttg gca ctg ctc ctg ctg gcc gcc tgg acg gct cgg 48  
Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg  
1 5 10 15

gcg ctg gag gta ccc act gat ggt aat gct ggc ctg ctg gct gaa ccc 96  
Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro  
20 25 30

cag att gcc atg ttc tgt ggc aga ctg aac atg cac atg aat gtc cag 144  
Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln  
35 40 45

aat ggg aag tgg gat tca gat cca tca ggg acc aaa acc tgc att gat 192  
Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp  
50 55 60

acc aag gaa ggc atc ctg cag tat tgc caa gaa gtc tac cct gaa ctg 240  
Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu  
65 70 75 80

cag atc acc aat gtg gta gaa gcc aac caa cca gtg acc atc cag aac 288  
Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn  
85 90 95

tgg tgc aag cgg ggc cgc aag cag tgc aag acc cat ccc cac ttt gtg 336  
Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val  
100 105 110

att ccc tac cgc tgc tta gtt ggt gag ttt gta agt gat gcc ctt ctc 384  
Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu  
115 120 125

gtt cct gac aag tgc aaa ttc tta cac cag gag agg atg gat gtt tgc 432  
Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys  
130 135 140

gaa act cat ctt cac tgg cac acc gtc gcc aaa gag aca tgc agt gag 480  
Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu  
145 150 155 160

aag agt acc aac ttg cat gac tac ggc atg ttg ctg ccc tgc gga att 528  
Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile  
165 170 175

gac aag ttc cga ggg gta gag ttt gtg tgt tgc cca ctg gct gaa gaa 576  
Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu  
180 185 190



agt gac aat gtg gat tct gct gat gcg gag gag gat gac tcg gat gtc 624  
Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val  
195 200 205

tgg tgg ggc gga gca gac aca gac tat gca gat ggg agt gaa gac aaa 672  
Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys  
210 215 220

gta gta gaa gta gca gag gag gaa gaa gtg gct gag gtg gaa gaa gaa 720  
Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu  
225 230 235 240

gaa gcc gat gat gac gag gac gat gag gat ggt gat gag gta gag gaa 768  
Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu  
245 250 255

gag gct gag gaa ccc tac gaa gaa gcc aca gag aga acc acc agc att 816  
Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile  
260 265 270

gcc acc acc acc acc acc acc aca gag tct gtg gaa gag gtg gtt cga 864  
Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg  
275 280 285

gag gtg tgc tct gaa caa gcc gag acg ggg ccg tgc cga gca atg atc 912  
Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile  
290 295 300

tcc cgc tgg tac ttt gat gtg act gaa ggg aag tgt gcc cca ttc ttt 960  
Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe  
305 310 315 320

tac ggc gga tgt ggc ggc aac cgg aac aac ttt gac aca gaa gag tac 1008  
Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr  
325 330 335

tgc atg gcc gtg tgt ggc agc gcc atg tcc caa agt tta ctc aag act 1056  
Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr  
340 345 350

acc cag gaa cct ctt ggc cga gat cct gtt aaa ctt cct aca aca gca 1104  
Thr Gln Glu Pro Leu Gly Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala  
355 360 365

gcc agt acc cct gat gcc gtt gac aag tat ctc gag aca cct ggg gat 1152  
Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp  
370 375 380

gag aat gaa cat gcc cat ttc cag aaa gcc aaa gag agg ctt gag gcc 1200  
Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala  
385 390 395 400

aag cac cga gag aga atg tcc cag gtc atg aga gaa tgg gaa gag gca 1248  
Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala  
405 410 415

gaa cgt caa gca aag aac ttg cct aaa gct gat aag aag gca gtt atc 1296  
Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile  
420 425 430

cag cat ttc cag gag aaa gtg gaa tct ttg gaa cag gaa gca gcc aac 1344  
Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn  
435 440 445

gag aga cag cag ctg gtg gag aca cac atg gcc aga gtg gaa gcc atg 1392  
Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met  
450 455 460

ctc aat gac cgc cgc cgc ctg gcc ctg gag aac tac atc acc gct ctg 1440  
Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu  
465 470 475 480

cag gct gtt cct cct cgg cct cgt cac gtg ttc aat atg cta aag aag 1488  
Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys  
485 490 495

tat gtc cgc gca gaa cag aag gac aga cag cac acc cta aag cat ttc 1536  
Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe  
500 505 510

gag cat gtg cgc atg gtg gat ccc aag aaa gcc gct cag atc cgg tcc 1584  
Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser  
515 520 525

cag gtt atg aca cac ctc cgt gtg att tat gag cgc atg aat cag tct 1632  
Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser  
530 535 540

ctc tcc ctg ctc tac aac gtg cct gca gtg gcc gag gag att cag gat 1680  
Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp  
545 550 555 560

gaa gtt gat gag ctg ctt cag aaa gag caa aac tat tca gat gac gtc 1728  
Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val  
565 570 575

ttg gcc aac atg att agt gaa cca agg atc agt tac gga aac gat gct 1776  
Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala  
580 585 590

ctc atg cca tct ttg acc gaa acg aaa acc acc gtg gag ctc ctt ccc 1824  
Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro  
595 600 605

gtg aat gga gag ttc agc ctg gac gat ctc cag ccg tgg cat tct ttt 1872  
Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe  
610 615 620

ggg gct gac tct gtg cca gcc aac aca gaa aac gaa gtt gag cct gtt 1920  
Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val  
625 630 635 640

gat gcc cgc cct gct gcc gac cga gga ctg acc act cga cca ggt tct 1968  
Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser  
645 650 655

ggg ttg aca aat atc aag acg gag gag atc tct gaa gtg aag atg gat 2016  
Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp  
660 665 670

gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt cat cat caa aaa ttg 2064  
Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu  
675 680 685

gtg ttc ttt gca gaa gat gtg ggt tca aac aaa ggt gca atc att gga 2112  
Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly  
690 695 700

ctc atg gtg ggc ggt gtt gtc ata gcg aca gtg atc gtc atc acc ttg 2160  
Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu  
705 710 715 720

gtg atg ctg aag aag aaa cag tac aca tcc att cat cat ggt gtg gtg 2208  
Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val  
725 730 735

gag gtt gac gcc gct gtc acc cca gag gag cgc cac ctg tcc aag atg 2256  
Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met  
740 745 750

cag cag aac ggc tac gaa aat cca acc tac aag ttc ttt gag cag atg 2304  
Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met  
755 760 765

cag aac tag 2313  
Gln Asn  
770

<210> 9

<211> 770

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg  
1 5 10 15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro  
20 25 30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln  
35 40 45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp  
50 55 60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu  
65 70 75 80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn  
85 90 95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val  
100 105 110

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu  
115 120 125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys  
130 135 140

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu  
145 150 155 160

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile  
165 170 175

Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu  
180 185 190

Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val  
195 200 205

Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys  
210 215 220

Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu  
225 230 235 240

Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu  
245 250 255

Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile  
260 265 270

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg  
275 280 285

Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile  
290 295 300

Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe  
305 310 315 320

Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr  
325 330 335

Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr  
340 345 350

Thr Gln Glu Pro Leu Gly Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala  
355 360 365



Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp  
370 375 380

Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala  
385 390 395 400

Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala  
405 410 415

Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile  
420 425 430

Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn  
435 440 445

Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met  
450 455 460

Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu  
465 470 475 480

Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys  
485 490 495

Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe  
500 505 510

Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser  
515 520 525

Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser  
530 535 540

Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp  
545 550 555 560

Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val  
565 570 575

Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala  
580 585 590

Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro  
595 600 605

Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe  
610 615 620

Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val  
625 630 635 640

Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser  
645 650 655

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp  
660 665 670

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu  
675 680 685

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly  
690 695 700

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu  
705 710 715 720

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val  
725 730 735

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met  
740 745 750

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met  
755 760 765

Gln Asn  
770

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr  
1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu  
1 5 10

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Leu Val Met Leu Lys Lys Lys  
1 5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Val Met Leu Lys Lys Lys

1

5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05017

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K5/00, 7/00, 16/44, C12N9/99

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K5/00-7/66, C12N9/99

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CA/REGISTRY (STN), JSTPLUS (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	GU Y. et al., Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch. J.Biol.Chem., 21 September, 2001 (21.09.01), p.35235-8	15 1-14, 16
Y	SHEARMAN M.S. et al., L-685, 458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity. Biochemistry, 01 August, 2000 (01.08.00), 39(30), p.8698-704	1-16
Y	WOLFE M.S. et al., A substrate-based difluoro ketone selectively inhibits Alzheimer's gamma-secretase activity. J.Med.Chem., 01 January, 1998 (01.01.98), 41(1). pages 6 to 9	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
12 June, 2003 (12.06.03)

Date of mailing of the international search report  
24 June, 2003 (24.06.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05017

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	STEVEN R. et al., In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. Science, 1999, 285, pages 1569 to 1572	13 1-12, 14-16
Y A	WEIDEMANN A. et al., A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrated homology with Notch processing. Biochemistry, 26 February, 2002 (26.02.02), 41(8), p.2825-35	1-4, 6, 7, 9, 10, 12-16 5, 8, 11
A	PINNIX I. et al., A novel gamma -secretase assay based on detection of the putative C-terminal fragment-gamma of amyloid beta protein precursor. J.Biol.Chem., 05 January, 2001 (05.01.01), 276(1), p.481-7	1-16
A	FIGUEIREDO-PEREIRA M.E. et al., Distinct secretases, a cysteine protease and a serine protease, generate the C termini of amyloid beta-proteins Abeta1-40 and Abeta1-42, respectively. J.Neurochem., 1999 Apr., 72(4), p.1417-22	1-16
A	EP 236734 A2 (CIBA GEIGY AG), 16 September, 1987 (16.09.87), & JP 62-252757 A & US 4758584 A	1-16
A	GHOSH A.K. et al., Structure-based design: potent inhibitors of human brain memapsin 2. (.beta.-secretase). Journal of Medicinal Chemistry, 2001, 44(18), pages 2865 to 2868	1-16
A	CHONG K.T. et al., Peptidomimetic HIV protease inhibitors: phosphate prodrugs with improved biological activities. Journal of Medicinal Chemistry, 1993, 36(17), p.2575-7	1-16
A	TIAN G. et al., Linear non-competitive inhibition of solubilized human gamma-secretase by peptatin A methyl ester, L685458, sulfonamides, and benzodiazepines. J.Biol.Chem., 30 August, 2002 (30.08.02), 277(35), p.31499-505	1-16

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C07K5/00, 7/00, 16/44, C12N9/99

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C07K5/00-7/66, C12N9/99

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

CA/REGISTRY (STN)

JSTPLUS (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	GU Y et al., Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch. J Biol Chem, 2001 Sep 21, 276 (38), p. 35235-8	15 1-14, 16
Y	SHEARMAN M S et al., L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity. Biochemistry, 2000 Aug 1, 39 (30). p. 8698-704	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.06.03

国際調査報告の発送日

24.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伏見 邦彦

印

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WOLFE M S et al., A substrate-based difluoro ketone selectively inhibits Alzheimer's gamma-secretase activity. J Med Chem, 1998 Jan 1. 41(1). p. 6-9	1-16
Y A	STEVEN R et al., In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. Science, 1999, 285, p. 1569-1572	13 1-12, 14-16
Y A	WEIDEMANN A et al., A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. Biochemistry, 2002 Feb 26, 41(8), p. 2825-35	1-4, 6, 7, 9, 10, 12-16 5, 8, 11
A	PINNIX I et al., A novel gamma -secretase assay based on detection of the putative C-terminal fragment-gamma of amyloid beta protein precursor. J Biol Chem, 2001 Jan 5, 276(1), p. 481-7	1-16
A	FIGUEIREDO-PEREIRA M E et al., Distinct secretases, a cysteine protease and a serine protease, generate the C termini of amyloid beta-proteins Abeta1-40 and Abeta1-42, respectively. J Neurochem, 1999 Apr, 72(4), p. 1417-22	1-16
A	EP 236734 A2 (CIBA GEIGY AG) 1987. 09. 16 &JP 62-252757 A & US 4758584 A	1-16
A	GHOSH A K et al., Structure-based design: potent inhibitors of human brain memapsin 2 (.beta.-secretase). Journal of Medicinal Chemistry, 2001, 44(18), p. 2865-2868	1-16
A	CHONG K T et al., Peptidomimetic HIV protease inhibitors: phosphate prodrugs with improved biological activities. Journal of Medicinal Chemistry, 1993), 36(17), p. 2575-7	1-16
A	TIAN G et al., Linear non-competitive inhibition of solubilized human gamma-secretase by pepstatin A methylester, L685458, sulfonamides, and benzodiazepines. J Biol Chem, 2002 Aug 30, 277(35), p. 31499-505	1-16